Augenstielkomplex und circadiane Rhythmik der Hämolymphglucose beim Flußkrebs

sowie

Untersuchungen über die Hämocytenaggregation bei der Crustaceen - Blutgerinnung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alf Hamann
aus Marburg/L.
1973

AUGENSTIELKOMPLEX UND CIRCADIANE RHYTHMIK DER HÄMOLYMPHGLUCOSE BEIM FLUSSKREBS

sowie

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE HÄMOCYTENAGGREGATION BEI DER CRUSTACEEN - BLUTGERINNUNG

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alf Hamann
aus Marburg/L.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Keller

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Kümmel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.8.1973

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Tierphysiologie und Angewandte Zoologie der Freien Universität Berlin angefertigt.
Für die Anregung zur Thematik des I. Teils und die Betreuung der Arbeit bin ich Herrn Prof. Keller sehr zu Dank verpflichtet. Mit kritischen Diskussionen und vielfältigen Anregungen waren mir auch die übrigen Institutsangehörigen sowie Prof. Kümmel, Prof. Passow und meine Kommilitonen eine wertvolle Hilfe. Prof. Passow danke ich zusätzlich für die Möglichkeit der Benutzung der Rechenanlage des MPI für Biophysik, Frankfurt.
Weiterhin wäre die Arbeit nicht möglich gewesen ohne die praktische Tätigkeit der Arbeiter und Angestellten des Instituts und der Bibliotheken.
Schließlich schulde ich Dr.G.Schwoch besonderen Dank für ihre hilfreiche Kritik bei Anfertigung und Abfassung der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0107

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

TEIL I 7

Einleitung 7

Material und Methoden

Tiermaterial 11
Probenentnahme 11
Glucosebestimmung 15
Messung der lokomotorischen Aktivität 16
Messung des Sauerstoff-Verbrauchs 16
Operationstechnik 18
Statistische Analyse 18

Ergebnisse und Diskussion

I. Charakterisierung der tagesrhythmischen Schwankungen der Hämolymphglucose
a) Nachweis einer Glucoserhythmik 19
b) Die Rolle äußerer Faktoren 23
c) Die mögliche Rolle anderer endogener Rhythmen . 26

II. Glucoserhythmik und Augenstielkomplex 32

III. Wahrnehmung des Zeitgebers 37

Zusammenfassung 39

Literaturangaben 41

TEIL II 47

Einleitung 48

Material und Methoden

Tiermaterial 51
Aggregationstest 51
Gewinnung gewaschener Hämocyten 54
Aufarbeitung der Gewebsfaktoren 54
Aufarbeitung der Hämocytenfaktoren 55

Seite

Ergebnisse

1. Nachweis verschiedener Aggregationsfaktoren . . 56
2. Einfluß verschiedener Substanzen und des pH auf die Aggregation 60

Diskussion

1. Auslösende Faktoren 64
2. Veränderungen an den Hämocyten 66
3. Molekularer Mechanismus der Aggregation . . . 70

Zusammenfassung 79

Literaturangaben 80

Anhang:

Lebenslauf

Teil I

AUGENSTIELKOMPLEX UND CIRCADIANE RHYTHMIK DER HÄMOLYMPHGLUCOSE BEIM FLUSSKREBS

Einleitung

Der Augenstielkomplex der Crustaceen mit neurosekretorischen Zellen in der Medulla externa, interna und terminalis und der Sinusdrüse als Neurohämalorgan ist als ein Zentrum der hormonalen Regulation bekannt. Es seien hier nur einige Prozesse genannt, von denen angenommen wird, daß sie durch Augenstielhormone gesteuert werden: Häutung, Farbwechsel, Wanderung des Retinapigments, Kohlenhydratstoffwechsel, lokomotorische Aktivität, Calcium-Stoffwechsel u.a. (Übersichten bei CARLISLE u. KNOWLES, 1959; SCHEER, 1960; KLEINHOLZ, 1966; FINGERMAN, 1970).
Neben den die Pigmentzellen kontrollierenden Neurohormonen ist besonders das hyperglykämische Hormon näher untersucht, das erstmals von ABRAMOWITZ et al. (1944) aufgrund der Wirkung injizierter Augenstielextrakte auf den Hämolymphzucker nachgewiesen wurde. Es ist ein Proteohormon (KLEINHOLZ et al., 1967; KELLER, 1968) mit einem Molekulargewicht von 6000 -6500 (KLEINHOLZ u. KELLER, in Vorbereitung), das vermutlich in den neurosekretorischen Zellen der optischen Ganglien synthetisiert und von den in der Sinusdrüse zusammengefaßten Axonendigungen gespeichert und nach Bedarf freigesetzt wird. Es wirkt durch Steuerung der Enzyme des Glycogen-Stoffwechsels (KELLER, 1965, 1966) sowie Mobilisierung von Oligosaccharidepots (v.a. Trehalose) in Geweben wie z.B. dem Schwanzmuskel (SCHWOCH, 1972).

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die Frage nach biologischen Funktionen des hyperglykämischen Hormons.

Bisherige Untersuchungen geben darauf noch keine befriedigende Antwort. So ist u.a. die wichtige Frage, ob das Hormon, ähnlich wie das Paar Insulin-Glucagon bei Wirbeltieren, im Sinne homöostatischer Regulierung des Blut - (genauer: Hämolymph-)zuckerspiegels gegenüber exogenen Einflüssen wie Nahrungsaufnahme usw. wirkt, nicht untersucht.
Um die Bedeutung von hyperglykämischem Hormon bzw. Sinusdrüse für die Regulation der Blutglucose festzustellen, liegt es nahe, natürlich vorkommende Blutzuckerschwankungen und die Rolle der Sinusdrüse dabei zu untersuchen.
Für die durch Stress bewirkte Hyperglykämie wies KLEINHOLZ et al. (1950) nach, daß sie an das Vorhandensein einer intakten Sinusdrüse gebunden ist.
Für die tagesperiodischen Schwankungen des Blutzuckers, wie sie von NAGANO (1951) an der Garnele Paratya und von DEAN u. VERNBERG (1965) an der Krabbe Uca nachgewiesen wurden, lagen bisher keine derartigen Untersuchungen vor.
In der vorliegenden Arbeit soll daher die Tagesrhythmik der Blutglucose beim Flußkrebs und die Rolle des Augenstielkomplexes dabei näher beleuchtet werden.

Circadiane Rhythmen sind auf allen Ebenen biologischer Organisation, bei Zellorganellen, Zellen, Organen bis zu Organismen und Population, zu finden und umfassen eine Vielzahl verschiedener physiologischer Funktionen.
Von den verschiedenen Möglichkeiten einer Klassifizierung soll für die weitere Diskussion folgende Einteilung zugrundegelegt werden:
1. Selbständige Rhythmen, die durch eine aktive, endogene Steuerung des betreffenden Prozesses definiert sind; im Falle des Blutglucoserhythmus

beim Krebs dürfte im hyperglykämischen Hormon das Endglied des Steuermechanismus zu suchen sein.

Sie sind noch zu unterteilen in:

a) Rhythmen, die, als Ergebnis eines Evolutionsprozesses, eine optimale Anpassung an tagesperiodisch sich verändernde Umweltfaktoren gewährleisten;

b) Rhythmen, die nicht direkt eine Anpassung an Umweltfaktoren darstellen, sondern an einen anderen körpereigenen Rhythmus. Dies wäre beispielsweise eine mögliche Hypothese für die Funktion des Blutzuckerrhythmus, der für periodisch auftretenden Energiebedarf (etwa im Zusammenhang mit Nahrungssuche) die entsprechenden Reserven bereitstellt. Diese Art einer biologischen Kopplung sagt noch nichts aus über den physiologischen Zusammenhang, ob etwa beide Rhythmen von derselben "physiologischen Uhr" gesteuert werden oder nicht.

2. Unselbständige Rhythmen physiologischer Parameter, die nur als "mechanische" Auswirkungen anderer periodisch ablaufender Vorgänge auftreten. Auch dies wäre eine denkbare Hypothese für den Blutzuckerrhythmus, der sich z.B. als Folge periodischer Nahrungsaufnahme (in den zitierten Arbeiten und den eigenen Untersuchungen nicht in Betracht kommend, da während der Versuche nicht gefüttert wurde) oder als Folge periodisch wechselnden Glucose-Verbrauchs einstellen könnte.

Hierunter sind auch die Rhythmen zu zählen, die nur eine direkte Reaktion auf einen periodischen Reiz (etwa Licht/Dunkel) sind und unter konstanten Bedingungen sofort ausfallen. Ein Beispiel dafür ist der "lights-on"-Peak in der circadianen Rhythmik der lokomotorischen Aktivität von Procambarus clarkii, der im Dauerdunkel sofort verschwindet

und wahrscheinlich nichts anderes als eine photophobe Reaktion ist (PAGE u. LARIMER, 1972). Rhythmen dieser Art sind jedoch nicht häufig (ENRIGHT, 1965).

Die Beurteilung dieser Fragen stößt bei Rhythmen aus dem Bereich des Stoffwechsels auf besondere Schwierigkeiten, da ein bestimmter Parameter wie die Glucose-Konzentration in der Hämolymphe das Ergebnis des Zusammenspiels verschiedener Stoffwechselprozesse ist, die einzeln und insgesamt durch zahlreiche Faktoren beeinflußbar sind und die bei den Crustaceen weder in ihren quantitativen Verhältnissen noch in ihrer Dynamik auch nur einigermaßen befriedigend aufgeklärt sind.

Aus diesem Grunde wurden zusätzlich zum Blutglucoserhythmus die Tagesrhytmik von zwei anderen Parametern gemessen, deren Zusammenhang mit der Blutglucose besonders nahe liegt, nämlich der lokomotorischen Aktivität und des Energiestoffwechsels, gemessen am Sauerstoffverbrauch.

Die vorliegende Arbeit versucht zu einer vorläufigen Charakterisierung der Glucoserhythmik auf der Basis der genannten Einteilung zu kommen.

Ist die Abgrenzung eines Rhythmus von äußeren Einflüssen und anderen Rhythmen gelungen, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus seiner Steuerung, d.h. wo sitzt der verantwortliche Oszillator, die "physiologische Uhr", und wie funktioniert er, auf welchem Wege erfolgt die Umsetzung und wie werden als Zeitgeber wirkende Reize aufgenommen und verarbeitet.

Die vorliegenden Ergebnisse können hierin nur zu einer ersten Orientierung beitragen.

Material und Methoden

Tiermaterial

Es wurden ausschließlich männliche, ca. 2o-25g schwere Zwischenhäutungstiere der Art Orconectes limosus Rafinesque (Cambarus affinis Say) verwendet, die aus der Havel bei Berlin stammten. Vor der Verwendung wurden die Tiere in der Regel wenigstens 1-2 Wochen in fließendem Leitungswasser bei konstantem Lichtdunkelwechsel(LD12:12, 7-19 Uhr Licht) gehalten. Gefüttert (mit Herzfleisch) wurde bis höchstens 3 Tage vor einem Versuch. Während der Versuche wurden die Tiere in unterteilten Eternitbecken gehalten, die mit einer lichtdichten und ggf. beleuchteten Haube abgedeckt waren und mit thermostatiertem Wasser von 18°C durchströmt wurden. Zum Schutz gegen Erschütterungen standen die Becken im Keller, kleine Becken (25 l) zusätzlich auf Gummipuffern.

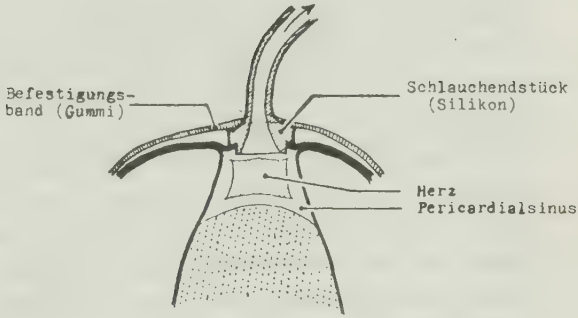
Probenentnahme

Bei der Messung von Rhythmen der Blutglucose ist die methodische Schwierigkeit zu überwinden, die in dem Stress-bedingten Blutzucker-Anstieg liegt. Das für die Blutentnahme nötige Hantieren läßt den Glucose-Spiegel z.T. auf sehr hohe Werte ansteigen, sodaß darauffolgende Messungen an demselben Tier keine sinnvollen Aussagen mehr gestatten. Dies kann durch eine Versuchsplanung auf statistischer Ebene umgangen werden, indem für jeden Meßzeitpunkt eine andere Gruppe von Tieren verwendet wird. Dies hat allerdings den Nachteil, daß der individuelle Verlauf der Glucosekonzentration unbekannt bleibt und, wegen der starken individuellen Variabilität des Glucosespiegels, die Aussageschärfe mäßig ist bzw. sehr viele Tiere verarbeitet werden müßten.

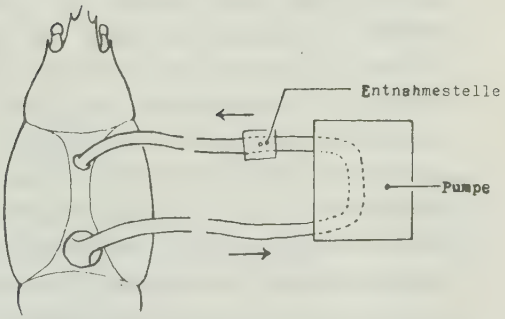
Aus diesem Grunde wurde versucht, durch die Konstruktion eines extrakorporalen Kreislaufs die mehrmalige Entnahme von Hämolymphe ohne Störung des Tieres möglich zu machen. Das Prinzip besteht darin, daß dem Tier an einer geeigneten Stelle das Ende eines Schlauches implantiert wird, durch den Hämolymphe angesaugt und durch das ebenfalls implantierte andere Ende wieder in den Körper gepumpt wird. Aus der außerhalb des Hälterungsbeckens liegende Schleife des Schlauches kann so jederzeit Hämolymphe entnommen werden, ohne daß das sich frei in seiner Hälterung bewegende Tier dadurch beeinträchtigt wird.
Leider schränkt die sehr intensive und bisher durch kein Mittel in vivo aufhebbare (HAMANN, unveröff.) Aggregation der Blutzellen und nachfolgenden Koagulation des Plasmas im Schlauchsystem die Brauchbarkeit der Methode stark ein. So bilden sich in den meisten Fällen nach kurzer Zeit Gerinnsel vor der Ansaugöffnung, die entweder den Schlauch verstopfen oder das Herz schädigen. (Der Operationsschock selber ist schnell überwunden, die Tiere nehmen am nächsten Tag wieder Nahrung zu sich.) Erfolgreich waren bisher nur eine Reihe von Versuchen in den Wintermonaten Januar-Februar, in denen die Zahl der Blutzellen und mit ihnen die Intensität der Blutgerinnung häufig stark reduziert ist. (SCHULZ, 1925; DEAN u. VERNBERG, 1966;).
Hier blieben die Tiere für 2-5 Wochen am Leben, wobei aber ein gewisser ständiger Verlust an Blutzellen durch deren Schädigung (Pumpe!) und Aggregation im Schlauchsystem sicherlich eine Belastung für den Organismus darstellt, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muß.

Die Ausführung des extrakorporalen Kreislaufs zeigt Abb. 1 a-c

a.



b.



c.

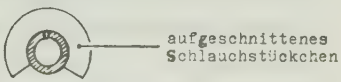


Fig. 1 a-c Anlage des extrakorporalen Kreislaufs
a. Querschnitt durch Krebs mit Schlauchanschluß
b. Gesamtanlage (Befestigungsbänder nicht gezeichnet)
c. Querschnitt durch Entnahmestelle

Als Schlauch wurde ein Silikonschlauch (Silastic Medical Grade) der Firma Dow Corning mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm und einer Länge von

ca. 1m verwendet, als Pumpe eine Fingerpumpe der Firma Bühler, Tübingen, die zusätzlich mit einer Wasserkühlung ausgestattet wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug o,2 bis o,4 ml/min. Gebrauchte Schläuche wurden mit 2-5 %iger alkalischer Natriumhypochloritlösung (verd. "Antiformin"), verdünnter HCL und warmer Detergentienlösung und anschließendmsorgfältigem Spülen mit dest. Wasser gereinigt. Der Anschluß der mit van Harreveld-Blutersatzlösung (VAN HARREVELD, 1936; modifiziert nach ANDREWS, 1967) gefüllten Schläuche erfolgte, nachdem den in Chloroform-Narkose betäubten Tieren unter dem Binokular mit einem Bohrer nach KLEINHOLZ (1947) die Löcher in den Panzer gefräst und vorsichtig das darunter liegende Integumentgewebe weggeschnitten wurde. Unter der (größeren) Entnahmeöffnung wurde nur ein Teil der Hypodermis entfernt, um das an Bändern daran aufgehängte Herz nicht zu schädigen. Instrumente und Blutersatzflüssigkeit wurden vor Gebrauch sterilisiert, doch erwies sich eine streng aseptische Arbeitsweise nicht als notwendig. Die Pumpe wurde in der Regel erst am Tag nach der Operation in Betrieb gesetzt, Messungen frühestens 5-6 Tage später vorgenommen. Pro Messung wurden jeweils 1o µl Hämolymphe entnommen, mit 4oµl o,4 M Perchlorsäure zur Enteiweißung versetzt und nach Zentrifugation in 4o µl Überstand die Glucose bestimmt.

Bei den Versuchen mit einer einzelnen, direkten Abnahme aus dem Krebs wurden nach Einritzen der Gelenkhaut 8o µl Hämolymphe mit einer Plastikpipette aus dem Coxalgelenk der hinteren Laufbeine entnommen, mit 2o µl 1,6 M Perchlorsäure gemischt und 5o µl des Überstands verwendet.

In einem Falle, bei Tieren mit durchtrenntem Sehnerv, wurden auch ohne Anwendung des extrakorporalen Kreislaufs mehrere Messungen an einem Tier vorgenommen, da eine Stress-Reaktion bei unterbrochener Verbindung zum Gehirn unterbleiben dürfte (vergl. KLEINHOLZ et al., 1950, die keine Stress-Hyperglykämie bei durchschnittenem Sinusdrüsennerv fanden) und bei der langen Meßdauer Störungen nicht so sehr ins Gewicht fallen. Abnahme in diesem Versuch: 20 µl, + 10 µl 1 M Perchlorsäure; 20 µl Überstand.

Glucosebestimmung

Die Bestimmung der Glucose-Konzentration erfolgte enzymatisch mit Hilfe des Hexokinase-Glucose-6-P-dehydrogenase-Tests (Boehringer). Gesamtvolumen des Ansatzes: 0,7 ml bei den 80 µl -, 0,3 ml bei den 20 µl-Hämolymphproben.

Für 10 µl-Proben aus den Versuchen mit extrakorporalem Kreislauf wurde der Test für fluorimetrische Messungen modifiziert. Hierbei wird die Fluoreszenz des auch im Absorptionstest bestimmten, bei der Reaktion stöchiometrisch entstehenden NADPH ausgenutzt. Angeregt wurde mit der Wellenlänge 366 nm, die untere Durchlaßgrenze des Sekundärfilters lag bei 420 nm, gemessen wurde in Quarzküvetten von 4 mm Breite und 1 cm Schichtlänge im Fluorimeterzusatz eines "Eppendorf"-Photometers der Fa. Netheler & Hinz. Die Emissionswerte wurde mit Hilfe einer Eichkurve im µg Glucose/ml umgerechnet. Bei einem Gesamtvolumen des Testansatzes von 0,6 ml waren so $2\text{-}4 \cdot 10^{-8}$ g Glucose (entsprechend einer Konzentration von 2,5 - 5 µg/ml in der Hämolymphe) noch gut nachweisbar. Nachteilig ist die größere Fehlerbreite, die bei 5 - 10 % liegt. Beachtet werden muß, daß durch längere Lagerung das für den Puffer verwendete Triäthanolamin verdorben sein kann und dann

stark stört, sodaß es umkristallisiert werden muß.

Messung der lokomotorischen Aktivität

Die Aufzeichnung der lokomotorischen Aktivität erfolgte mit am Krebs befestigten, wasserdichten Mikroschaltern der in Fig. 2 dargestellten Konstruktion, deren Kontakte sich bei Abbiegen berühren und die bei richtiger Anbringung des beweglichen Endes an einem Laufbein (vorzugsweise an einem der hinteren Paare) bei jedem "Schritt" des Krebses Stromimpulse erzeugen. Diese Impulse wurden über Relais und Magnethebel auf elektrosensitives Papier aufgezeichnet und zur Auswertung ausgezählt.

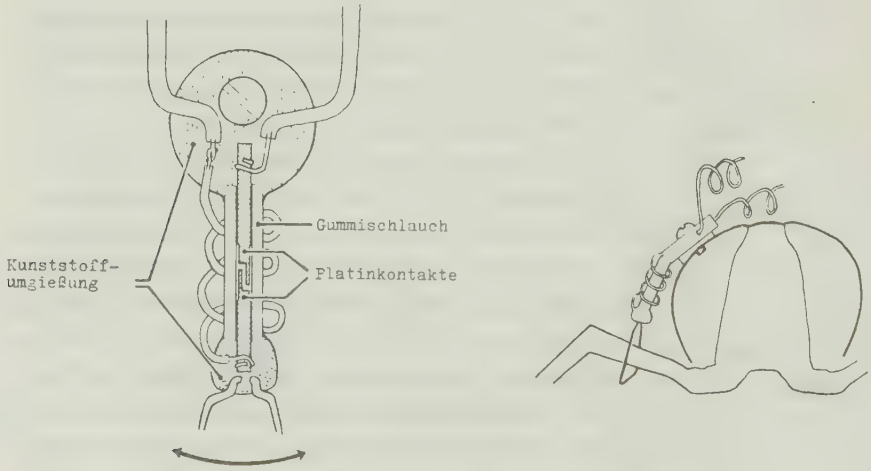


Fig.2 Konstruktion des Mikroschalters und seine Anbringung am Krebs

Messung des Sauerstoff-Verbrauchs

Der Sauerstoff-Verbrauch wurde kontinuierlich mit Hilfe einer Platinelektrode gemessen. Die Versuchsanordnung geht aus Fig. 3 hervor. Als Elektrode

wurde eine Clark-Elektrode Typ 4oo4 mit Teflon-Membrane der Fa. Yellow Spring Instrumentes Co., zur Aufzeichnung ein geringfügig modifizierter Oxygraph der Fa. Gilson benutzt.

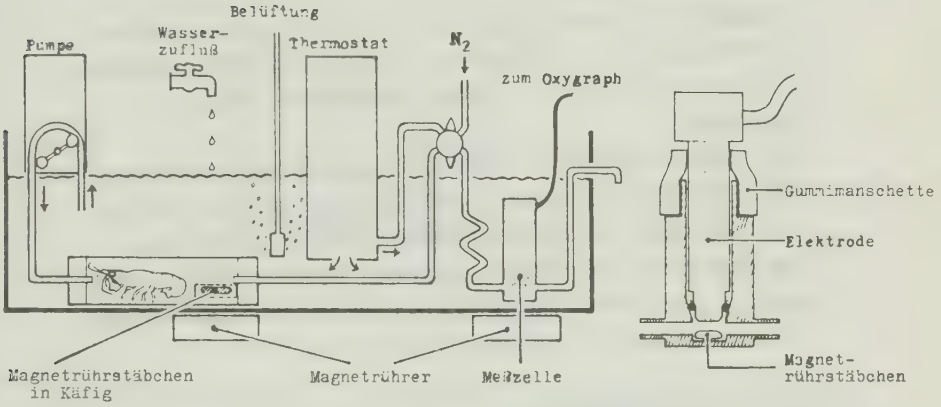


Fig.3 Meßanordnung für kontinuierliche Messung des O_2-Verbrauchs und Konstruktion der Meßzelle

Die Elektrodenspannung betrug -o,75 V, die Durchflußgeschwindigkeit des Atemwassers 11 bzw. 12 ml/min bei einem Totvolumen der Tierkammer von ca. 1oo ml. Zur Einstellung des Nullpunktes wurde Stickstoff durch die Meßkammer geleitet, als oberer Eichpunkt wurde das thermostatierte und durch ausreichende Belüftung O_2-gesättigte Beckenwasser gemessen, dessen Sauerstoffgehalt aus Tabellen berechnet wurde. Die kurzfristigen Schwankungen blieben bei dieser

Meßanordnung unter 3-4 %, doch machte sich bei über mehrere Tage andauernden Versuchen ein langsamer Schwund in der Anzeige bemerkbar, der durch Bakterienbewuchs, Veränderungen an der Elektrode usw. bewirkt wird und für statistische Berechnungen anhand mehrmaliger Eichmessungen während des Versuchs korrigiert wurde.

Operationstechnik

Sinusdrüsen wurden den Tieren nach der Methode von KLEINHOLZ (1947) entnommen, die entstehenden Löcher in der Cuticula mit schwarz gefärbtem Wachs verschlossen.
Der Sehnerv wurde (in Chloroformnarkose) nach Kappung der Rostrumspitze und dorsalem Einschnitt in den häutigen Teil des Augenstiels mit einer Iridektomie/schere durchschnitten. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß die Arteria optica nicht verletzt wurde.

Statistische Analyse

Varianzen wurden mit dem F-Test verglichen, Mittelwerte mit dem t-Test bzw. dem t-Test für Proben mit ungleichen Varianzen nach WELCH, zit. nach SACHS (1968) S. 27o-72. Die den Mittelwerten der Fig. 5-8 zugrundeliegenden Glucosewerte sind normal verteilt. Die Prüfung wurde an einigen zusammengefaßten Stichproben gleichen Mittelwertes vorgenommen.
Die in den graphischen Darstellungen angegebenen 95 %-Vertrauensbereiche für den Mittelwert fußen auf der t-Verteilung nach STUDENT. Die Meßwerte der lokomotorischen Aktivität wurden für statistische Berechnungen in Bruchteile vom Mittelwert des Tieres umgewandelt, um die individuellen Unterschiede im durchschnittlichen Aktivitätsniveau auszuschalten.

Für die Berechnung der Korrelation zwischen Glucose-Konzentration und lokomotorischer Aktivität bzw. O_2-Verbrauch wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN (SACHS, 1968 S. 390-93) angewandt, da die Normalverteilung der zugrundegelegten Glucosewerte zweifelhaft war. Ein bei längeren Meßreihen (O_2-Verbrauch, z.T. Glucose an Sehnerv-durchtrennten Tieren) manchmal auftretender, die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen störender Trend (durch Hunger, Blutentnahme usw. bedingtes Absinken der Meßwerte über mehrere Tage) wurde beseitigt, indem die Werte mit einer empirisch gefundenen Funktion multipliziert wurden ($Y_i' = Y_i \cdot f(i)$), sodaß die korrigierten Werte um eine Ausgleichsgerade mit der Steigung 0 oszillieren.

Ergebnisse und Diskussion

I. Charakterisierung der tagesrhythmischen Schwankungen der Hämolymphglucose von Orconectes limosus

a) Nachweis einer Glucose-Rhythmik

Der Glucosegehalt der Hämolymphe des Flußkrebses folgt unter Tag/Nacht-Bedingungen einer ausgeprägten circadianen Rhythmik. Das zeigen sowohl die Messungen an Einzeltieren mit Hilfe eines extrakorporalen Kreislaufes (Fig. 4) wie die statistischen Versuche (Fig. 5). In Fig. 4 ist der Verlauf der Glucosekonzentration in 3 verschiedenen Tieren sowie die simultan gemessene lokomotorische Aktivität aufgetragen. Die Messungen fanden im Februar statt, der Tag/Nachtrhythmus war entsprechend den natürlichen Verhältnissen 8:16 L/D . Die Tiere waren seit einer Woche an das Schlauchsystem angeschlossen und seit 3 Tagen von äußeren Störungen abgeschirmt.

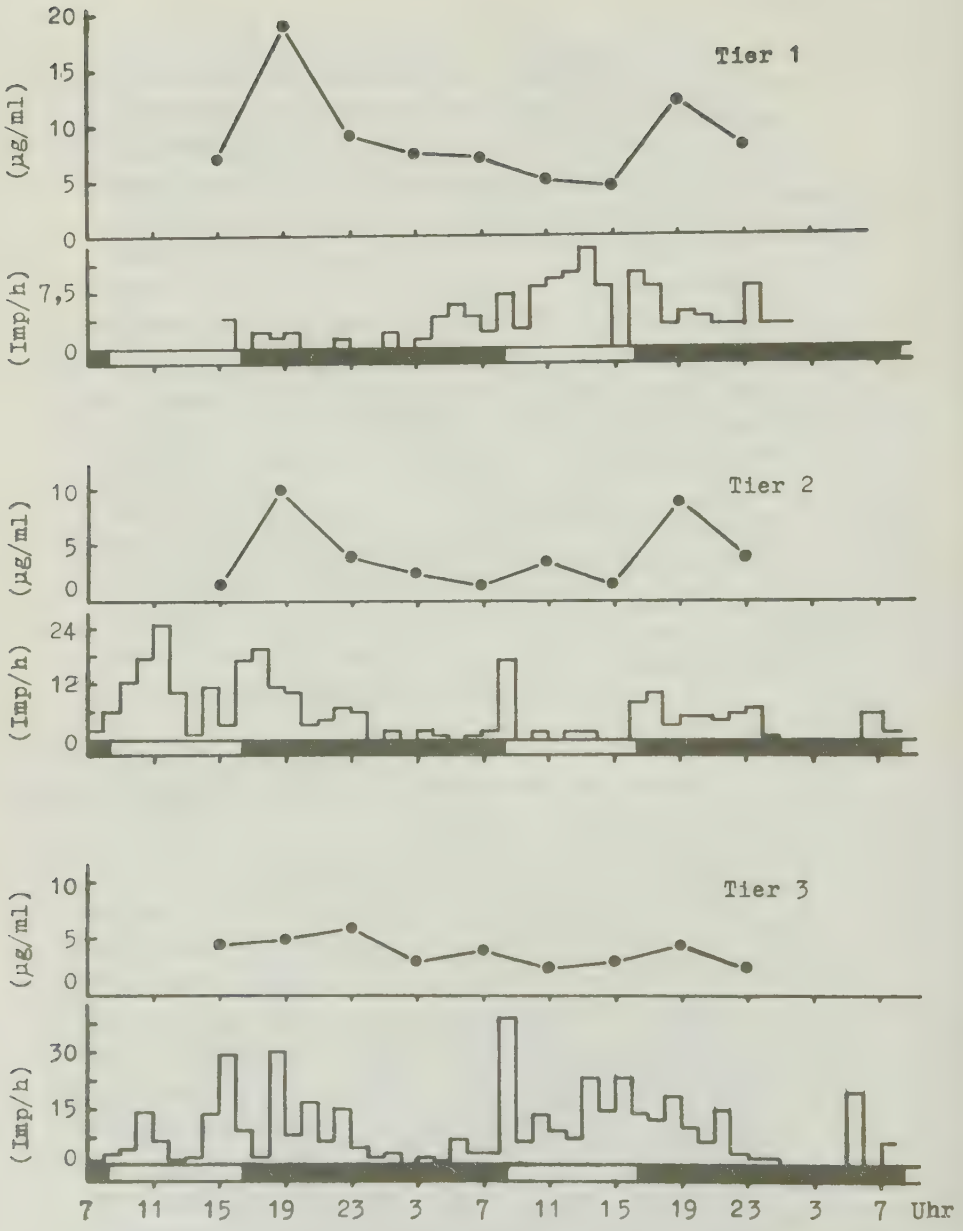


Fig.4 Glucosekonzentration in der Hämolymphe (obere Kurven) und simultan gemessene lokomotorische Aktivität (untere Kurven) im Tagesverlauf. Tiere mit extrakorporalem Kreislauf. Jahreszeit: Winter. LD 8:16. Schwarze Balken unter der Abszisse kennzeichnen die Dunkelphase.

Bei Tier 1 und 2 sind ausgeprägte, scharfe Maxima zu Beginn der Dunkelheit vorhanden, deren Werte das 3-fache bis 6-fache der Minimalwerte betragen. Tier 3 zeigt eine ziemlich schwach ausgebildete Rhythmik. Darüberhinaus sind Andeutungen eines zweiten Maximums in den Morgenstunden zu erkennen. Die Kurven zeigen, daß durchschnittliche Höhe des Glucosespiegels sowie die Amplitude der Rhythmik individuell stark variieren können und auch bei einem einzelnen Tier der Kurvenverlauf nicht sehr exakt reproduziert wird.
Auch der statistische Versuchsansatz (Fig. 5) mit Messungen Ende April bei L/D 12:12 ergibt eine klare Rhythmik, dessen Maximum etwa in der Mitte der Dunkelperiode liegt und ungefähr das 3-fache der Minimalwerte beträgt. Die Differenz zwischen Maxima und Minima ist mit $p < 0{,}01$ hoch signifikant.

Fig. 5 Glucose-Konzentration in der Hämolymphe in Abhängigkeit von der Tageszeit. L/D 12:12. Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert einer Tiergruppe mit n = 12 Tieren. Die Senkrechten geben den 95%-Vertrauensbereich an. Jahreszeit: Frühjahr

Fig. 6 Glucose-Konzentration im Tagesverlauf nach einer Woche Dauerdunkel. n = 8-10

Fig. 7 Glucose-Konzentration im Tagesverlauf nach 5 Wochen Dauerdunkel. n = 8

Fig. 8 Glucose-Konzentration im Tagesverlauf nach 5-Wochen Dauerdunkel und anschließend 3 Tagen Licht-Dunkel-Wechsel. n = 7-10

Fig. 5

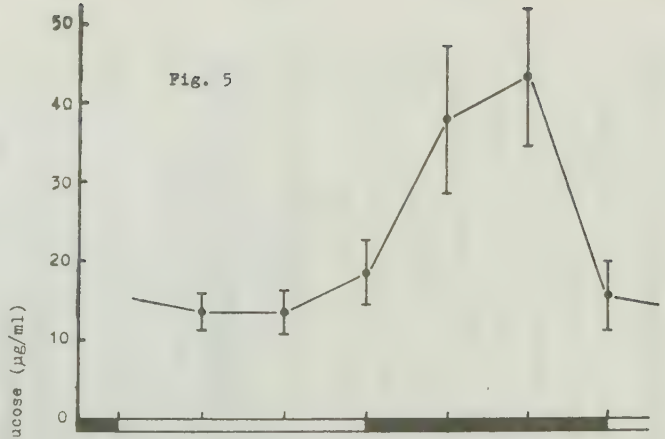


Fig. 7

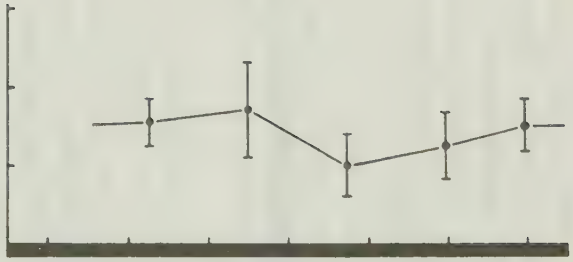


Fig. 6

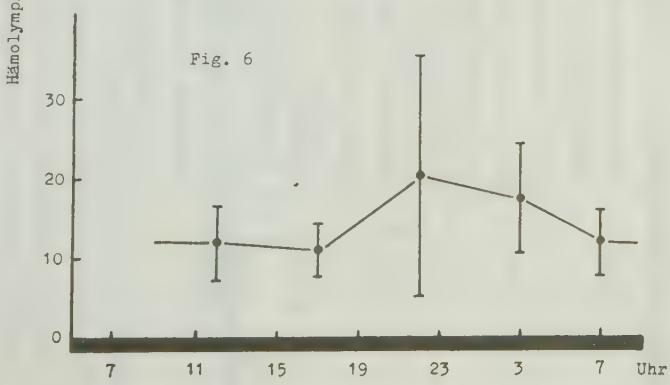
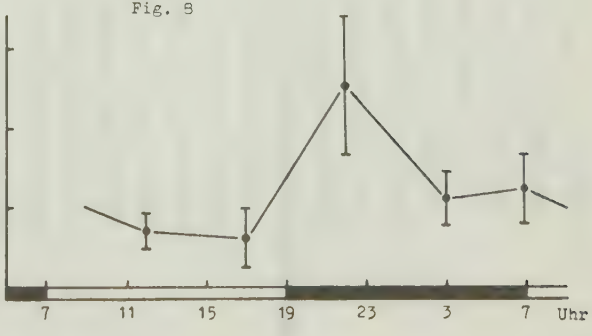


Fig. 8



Hämolymphglucose (µg/ml)

Tageszeit

b) Die Rolle äußerer Faktoren

Ist ein circadianer Rhythmus nicht nur Folge eines periodischen äußeren Reizes, sondern endogen bedingt, muß er auch unter konstanten Bedingungen für eine gewisse Zeit lang weiterlaufen. In den Versuchen von Fig. 4 und 5 waren die als steuernde bzw. induzierende Reize -außer dem Licht- hauptsächlich in Frage kommenden Faktoren Temperatur und periodische Nahrungsaufnahme bereits ausgeschaltet. In Fig. 6 ist das Ergebnis von Messungen an Gruppen von Tieren aufgeführt, die nach normalem Tag/Nacht-wechsel von 12:12 eine Woche im Dauerdunkel gehalten wurden, in Fig. 7 nach 5 Wochen Dauerdunkel und in Fig. 8 dieselben Tiere nach anschließender 3-tägiger Beleuchtung im normalen Tag/Nacht-Rhythmus.

Mitden vorliegenden Messungen läßt sich nach 1 Woche konstanter Bedingungen der Rhythmus nicht mehr eindeutig nachweisen, zwar ähnelt der Kurvenverlauf dem in Fig. 5 gezeigten, doch ist die Amplitude sehr viel niedriger und die zum Maximalwert gehörende Streuung hoch, sodaß die Rhythmik statistisch nicht gesichert ist. Ob dieses Ergebnis im Widerspruch zu den Messungen von DEAN u. VERNBERG (1965) steht, die eine ausgeprägte Rhythmik auch im Dauerdunkel fanden, muß offenbleiben, da die Autoren nicht angeben, wie lange ihre Versuchstiere vor den Messungen im Dunkeln gehalten wurden.
Nach 5 Wochen Dauerdunkel (Fig. 7) ist die Rhythmik nicht mehr erkennbar, was insbesondere der Vergleich mit dem Kurvenverlauf von Fig. 8, wo nach 3 Tagen anschließenden Licht/Dunkel-Wechsel wieder eine ausgeprägte Tagesrhythmik ($p < 0{,}01$) vorhanden ist, zeigt.

Das Verschwinden einer sichtbaren Rhythmik könnte auch als Desynchronisation der Einzelrhythmen gedeutet werden. Wenn Rhythmen über einen längeren Zeitraum frei laufen, dabei - wie oft der Fall - nicht mehr die ursprüngliche exakte 24-Stunden Periodik beibehalten und die neuen Periodenlängen induviduell verschieden sind, können sich die einzelnen Phasen so gegeneinander verschieben, daß nach Mittelung der Werte der einzelnen Tiere keine Rhythmik zutage tritt, obwohl sie u.U. individuell noch vollständig vorhanden ist.
Das Zutreffen dieser Möglichkeit kann rechnerisch überprüft werden. Die Gesamtvarianz der Stichprobe müßte nämlich höher sein, wenn zusätzlich zur individuellen Variabilität, den Meßfehlern usw. die Varianz von tageszeitlichen Schwankungen hinzutritt. Vergleicht man die Gesamtvarianz der Werte der Kontrolle (Fig. 8) mit der der Werte der Dauerdunkeltiere, so ist tatsächlich die Varianz der belichteten Tiere signifikant ($p < 0{,}01$) größer als die der Dunkeltiere, sodaß ein Verschwinden der Rhythmik aufgrund von Desynchronisation nicht in Frage kommt.

Es ist also offensichtlich die Anwesenheit von Lichtreizen für die Aufrechterhaltung des Glucoserhythmus erforderlich. Das müßte jedoch nicht unbedingt heissen, daß eine Licht-rhythmik Voraussetzung ist. Endogene Rhythmen können nämlich bei nicht optimalen Bedingungen "maskiert" sein (ASCHOFF, 1960), also z.B. nur bei schwachem Dauerlicht, nicht aber im Dauerdunkel, sichtbar werden.
Ein weiteres Experiment soll daher über die Alternative: endogen-exogen Auskunft geben:
Wenn der Glucoserhytmus exogen bedingt wäre, müßte er jeder Phasenverschiebung des Beleuchtungsrhythmus exakt folgen.

Endogene Rhythmen, wie etwa der Chromatophorenrhythmus bei Uca, der unter konstanten Bedingungen monatelang weiterläuft, passen sich bei einer Verschiebung des Lichtrhythmus um 12 Stunden diesem erst allmählich innerhalb von einem bis mehreren Tagen, je nach Beleuchtungsstärke, an (bei 425 Lux z.B. in 4 Tagen (BROWN et al., 1954b)). Diese allmählichen Übergänge zu einer verschobenen Phasenlage sind nach PITTENDRIGH (1960) ein Kennzeichen endogener circadianer Rhythmen. Wie Fig. 9 zeigt, hat sich jedoch nach 6 Tagen inversem, d.h. um 12 Std. (durch Verlängern der Hellphase) versetztem Lichtrhythmus der Glucoserhythmus der Tiere aus Fig. 8 nur um ca. 5 Std. verschoben, was in Hinblick auf das schnelle Abklingen der Rhythmik im Dauerdunkel überrascht und jedenfalls den endogenen Charakter der Rhythmik eindeutig beweist.

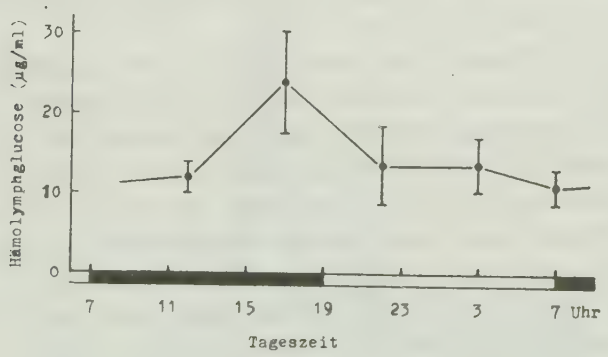


Fig. 9 Glucose-Konzentration im Tagesverlauf. Tiere aus Fig. 8 nach 6 Tagen unter einem um 12 Std. verschobenen Lichtrhythmus. Mittelwert von 8-9 Tieren.

Die Beleuchtungstärke lag dabei mit 200-400 Lux in der Größenordnung der von BROWN et al. verwendeten. Eine mögliche Erklärung für den Widerspruch wäre, daß einerseits die "Uhr" des Glucoserhythmus relativ autonom läuft,

andererseits aber die Amplitude der Zuckerschwankungen nur beim Vorhandensein eines Lichtreizes die normale Höhe hat. Die Vorstellung einer einfachen Stimulation der Zucker- bzw. Hormonausschüttung durch Licht reicht dabei nicht aus, da die maximalen Glucosewerte ja gerade in der Dunkelheitsphase auftreten.

c) Die mögliche Rolle anderer endogener Rhythmen

Auch wenn der Glucoserhythmus endogene Ursachen hat, braucht noch keine selbständige Rhythmik vorzuliegen. Es ist denkbar, daß tagesperiodisch auflaufende Prozesse, die Glucose verbrauchen oder liefern, rhythmische Schwankungen des Blutzuckerspiegels bewirken, ohne daß das hyperglykämische Hormon als vermutlich wesentlichster Regulator von Glucosefreisetzung und -speicherung rhythmisch steuernd eingreifen muß.
Über die glucoseproduzierende Seite des Gleichgewichts ist wenig bekannt. Weder ist die quantitative Bedeutung verschiedener Glucosequellen klar noch ist die zeitliche Organisation dieser Stoffwechselprozesse untersucht. Soweit die Glucose-Produktion jedoch auf den phosphorolytischen Glycogenabbau bzw. die Freisetzung aus Oligosaccaridspeichern (Trehalose) zurückgeht, wird sie über das hyperglykämische Hormon kontrolliert (KELLER, 1965, 1966; SCHWOCH, 1972) und berührt daher die obige Fragestellung nicht.
Von den in Frage kommenden glucoseverbrauchenden Prozessen ist eine Tagesperiodik bei der lokomotorischen Aktivität (KALMUS, 1938; u.a.) und dem Gesamtmetabolismus, gemessen am Sauerstoffverbrauch (EDWARDS, 1950; u.a.) bekannt.

Wie müßten nun die Beziehungen zwischen diesen Rhythmen einerseits und dem Glucoserhythmus andererseits aussehen, würde man von der obengenannten Hypothese ausgehen?
Unter der Voraussetzung, daß der Anteil der Glucose als Energiequelle gegenüber anderen Stoffklassen nicht zu gering und konstant ist, müßten hohe Aktivitätswerte ein Absinken des Zuckerspiegels zur Folge haben und umgekehrt. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Der Verlauf der lokomotorischen Aktivität (Fig. 1o) ähnelt dem des Glucose-Spiegels, wobei das Maximum eher noch etwas vor dem der Glucose liegt.

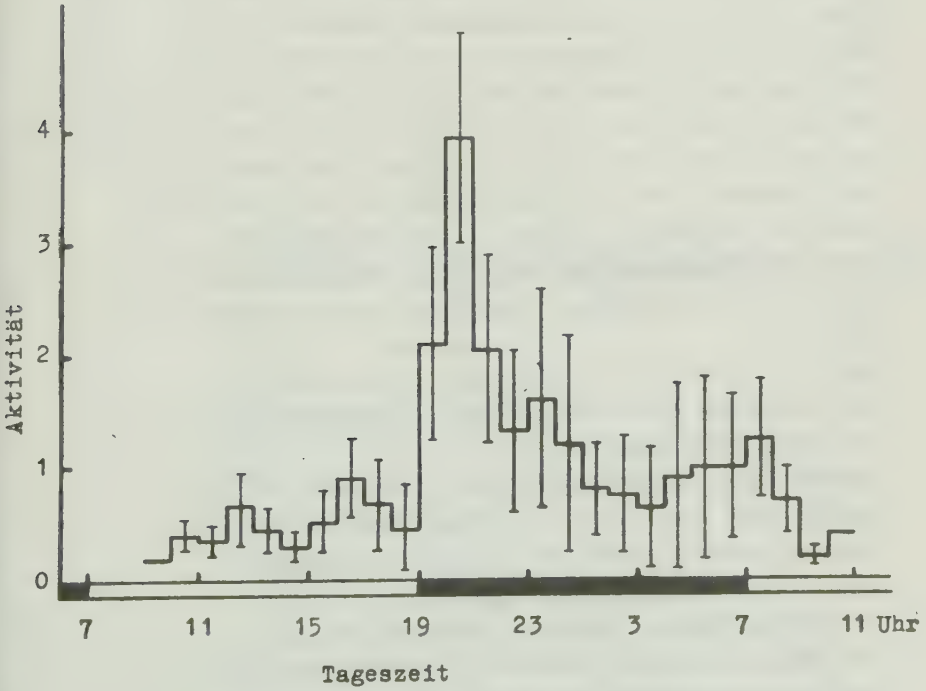


Fig. 10 Lokomotorische Aktivität im Tagesverlauf unter Tag/Nacht-Bedingungen. Mittelwerte mit 95%-Vertrauensbereich aus insgesamt 16 Meßtagen an 4 Tieren. Jahreszeit: Sommer. Ordinate: Aktivität, bezogen auf Gesamtmittelwert ($\bar{x}$=1).

Auch bei Betrachtung der simultanen Messungen an Einzeltieren (Fig. 4) ergibt sich der Schluß, daß der Glucose-Rhythmus nicht einfach Folge des periodisch wechselnden Verbrauchs von Zucker durch die lokomotorische Aktivität sein kann. Wenn man bei dem im Einzelfall recht unregelmäßigen Verlauf der Aktivität überhaupt eine Korrelation zu den Glucose-Werten feststellen kann, dann nur in dem Sinne , daß die Aktivitätsmaxima kurz vor einem Anstieg der Glucosewerte liegen.
Der Sauerstoffverbrauch kann, unter der (offensichtlich gegebenen) Voraussetzung eines oxidativen Abbaus (BERGREEN et al. 1961; ZANDEE, 1966 HUGGINS u. MUNDAY, 1968) als Indikator für die Summe aller energieverbrauchenden Prozesse benutzt werden. Die Hypothese von einem Glucoserhythmus als Folgeerscheinung von rhythmischen, energieverbrauchenden Prozessem kann also insgesamt nur aufrecht erhalten werden, wenn Sauerstoffrhythmus und Glucoserhythmus reziprok zueinander verlaufen. Hierbei ist allerdings wiederum ein tageszeitlich konstantes Verhältnis der Glucose zu anderen Energiequellen Voraussetzung.
Wie Fig. 11 zeigt, hat aber auch die Atmung, wie Aktivität und Glucosespiegel, ein Maximum zu Beginn der Dunkelphase.
(Die Form der Atmungskurve, mit einem scharf abgesetzten Gipfel und im übrigen fas konstanten Verlauf, weicht stark von der von FINGERMANN u. LAGO (1957) an Orconectes clypeatus oder von anderen Autoren an Uca usw. gemessen ab; es muß offen bleiben, inwieweit das auf verschiedene Versuchsbedingungen oder auf artspezifische Unterschiede zurückzuführen ist.)

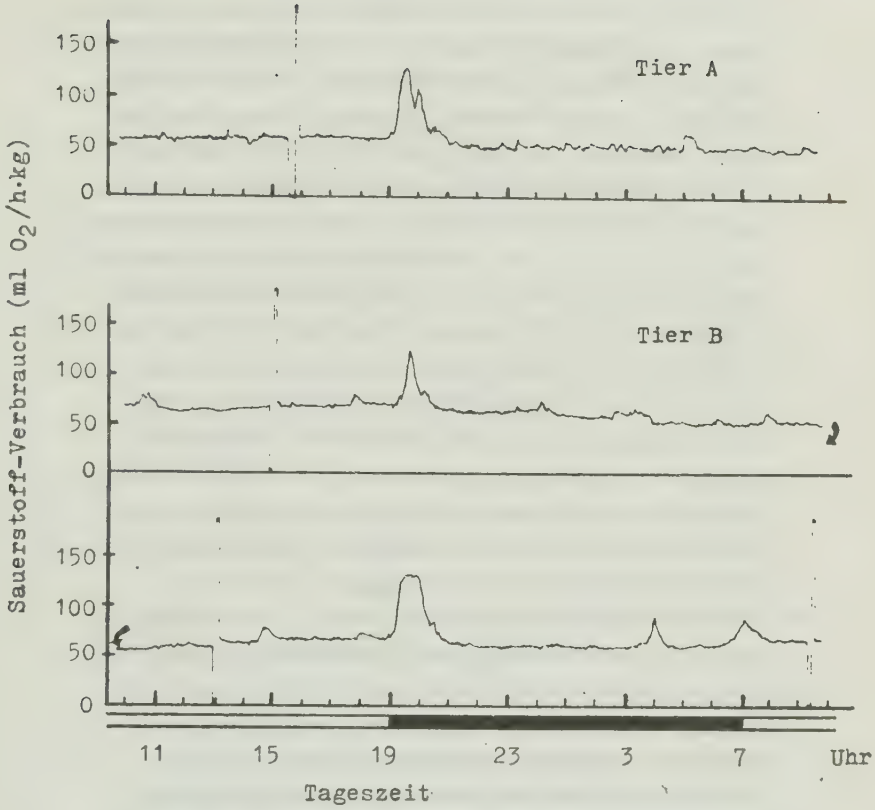


Fig.11 Sauerstoffverbrauch im Tagesverlauf unter Tag/Nacht-Bedingungen. Ausschnitte aus 2 Meßreihen. Jahreszeit:Sommer. Die strichförmigen Auslenkungen sind Eichmessungen.

Nachdem also periodischer Glucose-Verbrauch als Ursache der Glucoserhythmik offensichtlich nicht in Frage kommt, ist schließlich noch als weitere Interpretationsmöglichkeit auf der Basis einer unselbständigen Rhythmik denkbar, daß eine Verschiebung der Konzentration von Effektoren, Aktivatoren usw. als Folge erhöhter Stoffwechselintensität eine Aktivierung des Glycogenabbaues oder Glucosefreisetzung aus anderen Quellen hervorrufen könnte. So wies JANTZEN (1967) eine Vermehrung der aktiven Glycogenphosphorylase-Form a und Konzentrationsänderungen der für die Aktivität der Phospohorylase b bedeutsamen Nucleotide im Schwanzmuskel von Orconectes bei 1o-minütigem Herumjagen der Tiere nach, die einen verstärkten Glykogenabbau zur Folge haben dürften. Ebenso wäre eine Stimulierung der Ausschüttung des hyperglykämischen Hormons durch Stoffwechselprodukte denkbar.
Für diese Fälle würde man jedoch eine eindeutige Korrelation zwischen den Glucosewerten und der davor gemessenen lokomotorischen Aktivität bzw. Atmung erwarten. Das ist jedoch nicht der Fall. Die Werte für die Korrelationskoeffizienten (SPEARMAN'scher Rangkorrelationskoeffizient) zwichen den Glucosewerten und dem Wert der lokomotorischen Aktivität in den jeweils vorausgehenden 2 Stunden sind für die in Fig. 4 abgebildeten Meßreihen: Tier 1: - o,17
Tier 2: o,72
Tier 3: o,3o

Der Mittelwert daraus ist mit o,28 bei n= 26 Wertepaaren nicht signifikant (p> o,o5) von Null

verschieden. Die Korrelation ist noch geringer, geht man nicht von dem Aktivitätswert der vorausgehenden 2, sondern nur von dem der letzten Stunde vor der Aktivitätsmessung aus.
Dies Ergebnis, und besonders die Tatsache, daß verschiedene Korrelationsbeziehungen (positive und negative K.) bei Tieren mitwohlausgebildeter Glucoserhythmik (Tier 1 u. 2) auftreten, spricht gegen eine kausale Beziehung zwichen Glucose- und Aktivitätsrhythmik.
Der Koeffizient der Korrelation zwichen der Glucosekonzentration (Mittelwerte von je 12 Tieren, Fig. 5) und dem Sauerstoff-Verbrauch in den vorausgehenden 2 Stunden (Mittelwerte aus insgesamt 6 Meßreihen an 2 Tieren; z.T. Fig.11) beträgt nur o,o1.

Die erhaltenen Ergenisse lassen demnach die Annahme einer spezifischen Steuerung der Glucosekonzentration im Tagesrhythmus plausibel erscheinen, wenn auch ursächliche Beziehungen zwischen Aktivitäts- bzw. O_2-Rhythmik und Glucoserhythmik auf diesem Wege nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden können, da zuwenig über die quantitative Relevanz der enzymatischen bzw. hormonellen feed-back-Erscheihungen und die Geschwindigkeit ihrer Reaktionen bekannt ist. Dabei soll auch noch einmal an die Unsicherheitsfaktoren, die in der eingangs erwähnten Unkenntnis über evtl. weitere glucoseliefernde Prozesse und ihre Dynamik liegen, erinnert werden.

II. Glucoserhythmus und Augenstielkomplex

Bei Untersuchungen circadianer Rhythmen an dekapoden Crustaceen steht der neuroendokrine Komplex der Augenstiele im Mittelpunkt des Interesses. Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen sind je nach Rhythmus und Untersuchungsobjekt verschieden und geben kein einheitliches Bild.

Für die lokomotorische Aktivität stellten KALMUS (1938) bei Astacus, ROBERTS (1941) und SCHALLEK (1942) beim Cambarus, POWELL (1965) bei Carcinus den Verlust der Rhythmik nach Augenstielentfernung fest, ebenso NAYLOR u.WILLIAMS (1968), die auch mit dem Befund, daß selektive Kühlung der Augenstiele eine verlorengegangene Rhythmik wieder induziert, die Bedeutung der Augenstiele unterstreichen. BLISS (1962) konnte dagegen an Gecarcinus das Andauern der Rhythmik nach Entfernung der Augenstiele an einem einzelnen Tier beobachten und nach FINGERMANN u. LAGO (1957) hat die Augenstielentfernung bei Orconectes clypeatus keinen wesentlichen Einfluß auf die Rhythmik der lokomotorischen Aktivität und auch des O_2-Verbrauchs. Ebenso beschreiben BROWN et al (1954a) den Sauerstoffrhythmus bei Uca als Augenstiel-unabhängig.

Für den Blutzuckerrhythmus lagen bisher keine derarigen Untersuchungen vor. In den eigenen Versuchen wurde nur die Sinusdrüse herausoperiert, anstelle der etwas groben Methode der Entfernung der gesamten Augenstiele. Wie Fig.12 zeigt, ist eine Woche nach Entfernung der Sinusdrüse keinerlei Rhythmik des Glucosegehaltes

der Hämolymphe feststellbar. Außerdem liegt der Glucosespiegel signifikant unter dem der tiefsten Werte der unbehandelten Tiere (Fig.5), was noch einmal bestätigt, daß die Glucosekonzentration in der Hämolymphe durch eine ständige Ausschüttung von hyperglykämischen Hormon aufrecht erhalten wird.

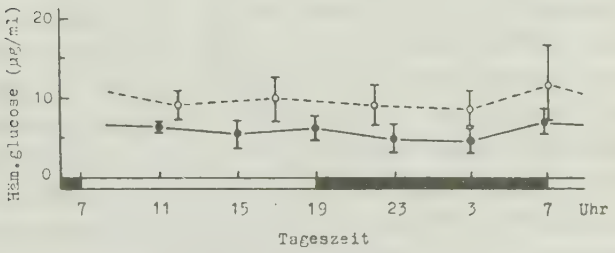


Fig. 12 Glucosekonzentration in sinusdrüsenlosen Tieren, 1 Woche (—•—) und 8 Wochen (---o---) nach der Operation. Mittelwerte von je 8 Tieren. Jahreszeit: Frühsommer.
(Vergleiche mit der Kontrolle (Fig.5))

Das Ergebnis der Sinusdrüsenentfernung demonstriert deutlich, daß die Steuerung der Glucoserhythmik eine endokrine Komponente einschließt, und man kann annehmen, daß die periodische Freisetzung von hyperglykämischen Hormon durch die Sinusdrüse das Endglied der Steuerung darstellt.

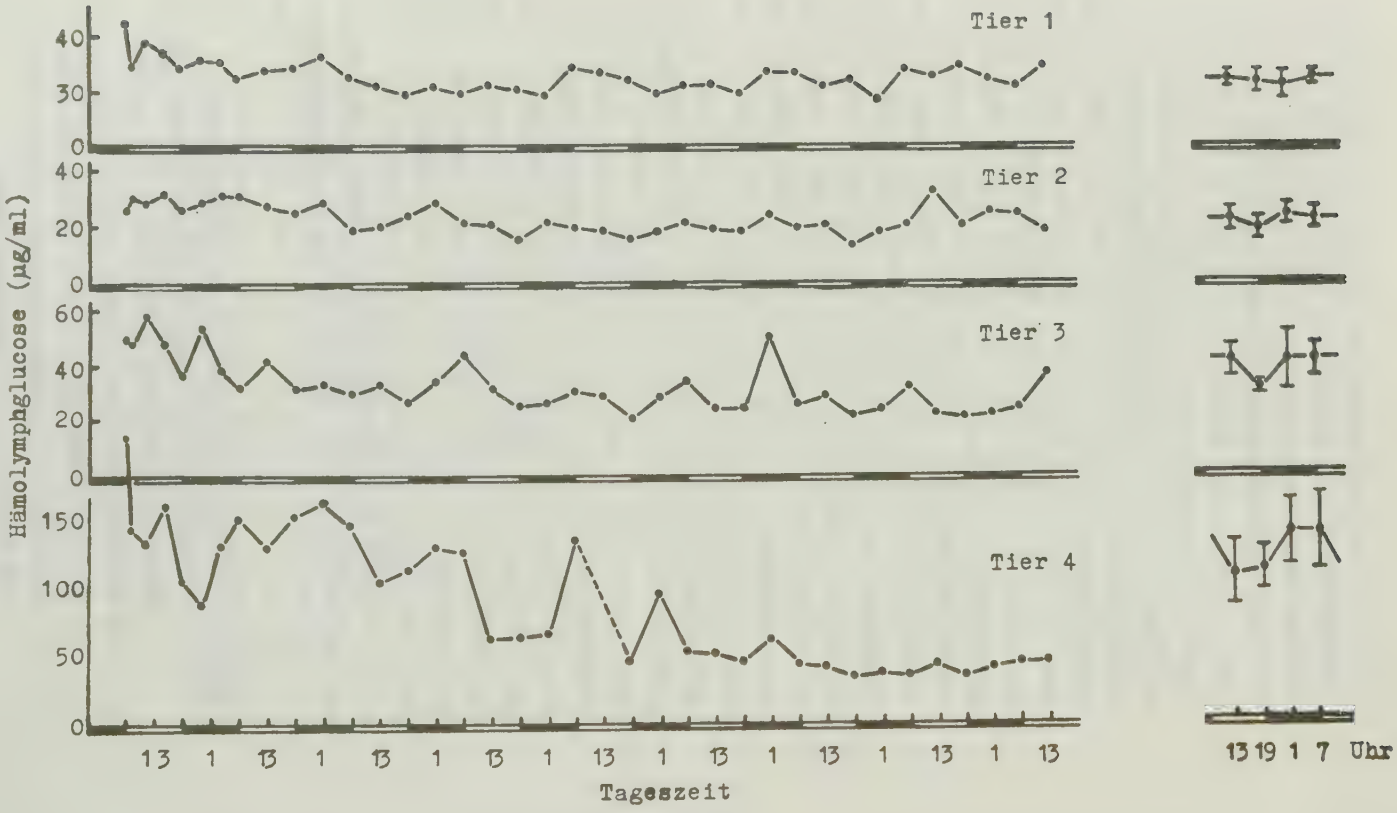
Der Rhythmus ist auch zwei Monate nach der Operation, bei normalem Tag/Nachtrhythmus, nicht wiedergekehrt, obwohl der Glucosespiegel insgesamt etwas gestiegen ist und man nach vergleich-

baren Zeiträumen histologisch eine Regeneration der Axonendigungen zu einer sinusdrüsen-ähnlichen Struktur beobachten kann (VERNET, (1969) an Pachygrapsus und eigene Beobachtungen),

Ein weiteres Experiment galt der Frage nach dem Sitz der "Uhr" des Glucoserhythmus. Während das Bestehenbleiben einer Rhythmik nach Augenstielentfernung, wie es die oben erwähnten Autoren für den Sauerstoffverbrauch und - in einigen Fällen - für die lokomotorische Aktivität fanden, für die Existenz von steuernden Oszillatoren außerhalb des Augenstiels spricht, sind entsprechende Versuche mit der Glucoserhythmik nicht aussagekräftig, da man mit der Sinusdrüse in jedem Falle das Endglied des Steuermechanismus entfernt.
Zur Klärung der Frage, ob allein der Augenstielkomplex für die Erzeugung der Glucoserhythmik verantwortlich ist, wurden augenstiellosen Tieren Augenstielkomplexe implantiert und anderen Tieren der Sehnerv durchgeschnitten.
Die Implantationsversuche waren leider nicht erfolgreich, da die Transplantate degenerierten, wie die histologische Überprüfung ergab. Die Ergenisse der Durchschneidung des Sehnervs zeigt Fig. 13. Obwohl bei der Operation speziell darauf geachtet wurde, daß die optische Arterie nicht verletzt wurde, starb ein Teil der Augenstiele im Verlauf des Versuchs ab (an Trübung der Retina erkennbar). Bei Tier 1-3 waren am Versuchsende noch einer, bei Tier 4 beide Augenstiele intakt. Die Schwankungen in der Glucosekonzentration sind ziemlich unregelmäßig, doch scheint zumindest bei Tier 3 und 4, evtl. auch bei Tier 2, eine

Tagesrhythmik vorhanden zu sein, wobei die Minima eine größere Regelmäßigkeit zeigen als die Maxima. Nach Zusammenfassung der Werte der einzelnen Tiere wird dies noch deutlicher (Fig. 13 b). Der Verlauf der Kurven zeigt wie der bei Normaltieren ein Minimum am Nachmittag; die Differenz zwischen hohen und niedrigen Werten ist bei Tier 3 mit $p < 0{,}01$ hoch signifikant und bei Tier 2 und 4 mit $p = 0{,}08$ bzw. $p = 0{,}06$ immerhin noch nahe der Signifikanzschwelle (für Tier 3 u. 4 an trendkorrigierten Werten berechnet). Das zeigt, daß eine nervöse Verbindung zwischen Gehirn und Augenstielkomplex für die Aufrechterhaltung einer Blutzuckerrhythmik augenscheinlich nicht notwendig ist. Der naheliegende Schluß wäre, daß die rhythmische Ausschüttung von hyperglykämischem Hormon durch einen in den optischen Ganglien liegendenOszillator bewirkt wird. Ebenso ist jedoch denkbar, daß die Sinusdrüse bzw. sie kontrollierende nervöse Elemente humoral von einer im Zentralnervensystem oder anderswo liegenden internen Uhr gesteuert wird. Eine Entscheidung über diese Alternativen kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht getroffen werden. In diesem Zusammenhang ist der Befund von ARECHIGA et al. (1971) interessant, die gleichsinnige, circadiane Schwankungen der Reaktivität und Spontanaktivität in Photo-, Motor- und Interneuronen des Augenstieles von Flußkrebsen fanden.

Fig. 13 Glucosekonzentration unter Tag/Nacht-Bedingungen in Tieren, denen 1 Woche zuvor die Sehnerven durchschnitten wurden
a) Einzelwerte über mehrere Tage (links)
b) statistisches Mittel des Tagesverlaufs (rechts); (1. Meßtag nicht verwandt, Werte von Tier 3 u. 4 trendkorrigiert)
Jahreszeit: Winter


Tier 1
Tier 2
Tier 3
Tier 4
Hämolymphglucose (µg/ml)
Tageszeit
13 1 13 1 13 1 13 1 13 1 13 1 13 1 13 1 13
13 19 1 7 Uhr

III. Wahrnehmung des Zeitgebers

Wie aus den Versuchen in Abschnitt I. hervorgeht, wirkt der Licht-Dunkelwechsel als Zeitgeber für den circadianen Rhythmus der Hämolymphglucose. Befunde aus neueren Untersuchungen haben gezeigt, daß die Wahrnehmung der für die Synchronisation der meisten Tagesrhythmen verantwortlichen Photoperiodik nicht immer über die Augen laufen muß; entsprechende extraretinale Rezeptoren wurden bei Vertebraten (MENAKER, 1968; UNDERWOOD u. MENAKER, 197o; ADLER, 1969) und Invertebraten (ZWICKY, 197o; ZIMMERMANN u. GOLDSMITH, 1971) gefunden bzw. wahrscheinlich gemacht.

Unter den extraretinalen Lichtrezeptoren ist der caudale Photorezeptor des Flußkrebses (PROSSER, 1934; WELSH, 1934; KENNEDY, 1963) seit langem bekannt. Es lag daher die Frage nahe, inwieweit dem räumlichen Zusammenhang zwischen Sinusdrüse und optischem System auch eine physiologische Verknüpfung entspricht.

Fig. 14 und 15 zeigen den Tagesverlauf der Glucosekonzentration in Tieren, bei denen 1 bzw. 5 Wochen vorher die gesamten Augenstiele samt Augenstielbasis und eines Teils der Rostrumspitze mit schwarzer Silikongummimasse abgedeckt wurden.

Im Vergleich zu den Kontrollen (Fig. 5) wird der allmähliche Verlust der circadianen Rhythmik deutlich, die Ergebnisse entsprechen ganz denen der Versuche, in denen die Tiere im Dauerdunkel gehalten wurden (Fig. 6 und 7). Es ist damit klar, daß der caudale Photorezeptor keine Rolle für die Aufrechterhaltung des Glucoserhythmus

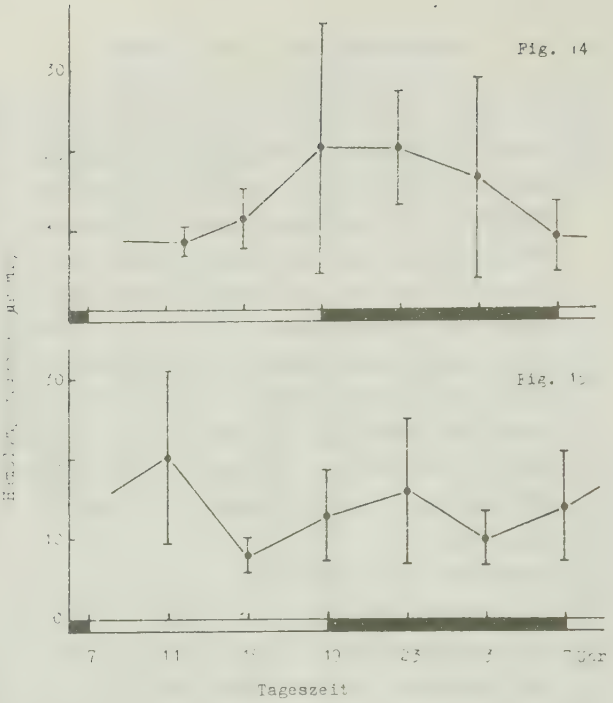


Fig. 14, 15 Glucosekonzentration im Tagesverlauf. Unter Tag/Nacht-Bedingungen gehaltene Tiere, denen 1 Woche (Fig. 14) bzw. 5 Wochen vorher (Fig. 15) die Augen abgedeckt wurden. Mittelwerte von je 8 Tieren. Jahreszeit: Frühsommer

im Licht-Dunkelwechsel spielt. Dies entspricht auch den Ergebnissen von PAGE u. LARIMER (1972), die die Synchronisation des Aktivitätsrhythmus mit der Photoperiode beim Flußkrebs untersuchten und fanden, daß der caudale Photorezeptor hierfür nicht notwendig ist. Zusätzlich stellten sie allerdings fest, daß auch die Entfernung der Retina samt Lamina ganglionaris keinen Einfluß auf die Wahrnehmung der Photoperiode hat und schlossen daraus auf einen extraretinalen, extracaudalen Photorezeptor. Das bedeutet, daß entweder nur die Aktivitätsrhythmik von einem extraretinalen

Rezeptor gesteuert wird, die Glucoserhythmik jedoch über die Komplexaugen, oder aber, daß der postulierte extraretinale Rezeptor so gelegen ist - etwa in den optischen Ganglien oder dem Protocerebrum - , daß mit der hier angewandten Technik die Lichtzufuhr zu ihm abgeblockt wird. Welche dieser beiden Alternativen zutrifft, müßten weitere Versuche zeigen.

Zusammenfassung

Es wurde die circadiane Rhythmik der Glucosekonzentration in der Hämolymphe des Flußkrebses unter verschiedenen Bedingungen untersucht, ihr Zusammenhang mit anderen circadianen Rhythmen des Krebsesdiskutiert und die Rolle des Augenstielkomplexes bei der Steuerung der Glucoserhythmik aufzuklären versucht:

1. Die Blutglucose zeigt unter Tag/Nacht-Bedingungen eine ausgeprägte circadiane Rhythmik mit hohen Konzentrationen in der Nacht und Minimalwerten am Nachmittag.

2. Im Dauerdunkel nimmt die Rhythmik innerhalb einer Woche stark an Amplitude ab und ist nach 5 Wochen nicht mehr nachweisbar.

3. Bei einer Phasenverschiebung des Lichtrhythmus um 12 Stunden hat sich die Glucoserhytmik nach 6 Tagen erst um 5 Stunden verschoben. Das spricht für einen endogenen Charakter der Rhythmik.

4. Die unter Tag/Nacht-Bedingungen gemessene Aktivitätsrhythmik zeigt im statistischen Mittel

einen ähnlichen Verlauf wie die Glucoserhythmik, der O_2-Verbrauch weist bei sonst relativ gleichförmigem Verlauf ein scharfes Maximum zu Beginn der Dunkelphase auf. Die Glucoserhythmik scheint keine Folge dieser Rhythmen zu sein.

5. Bei Entfernung der Sinusdrüse ist die Tagesrhythmik der Blutglucose verschwunden, ihre Konzentration insgesamt niedriger als in Vergleichstieren,

6. Bei Durchschneiden des Sehnervs scheint zumindest teilweise eine Tagesrhythmik der Glucose bestehen zu bleiben. Das deutet auf die optischen Ganglien als Sitz der "Uhr" des Glucoserhythmus hin, doch ist auch eine humorale Steuerung des Augenstiel-Komplexes durch einen an anderer Stelle liegenden Oszillator denkbar.

7. Die die Rhythmik steuernde Photoperiodik wird über die Komplexaugen oder einen im Bereich der Augenstiele - Augenstielbasis liegenden Photorezeptor wahrgenommen.

Literaturverzeichnis

ABRAMOWITZ, A.A., F.L.HISAW and D.N. PAPANDREA (1944): The occurence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. Biol.Bull. 86, 1-5

ADLER, K. (1969): Extraoptic phase shifting of circadian locomotor rhythm in salamanders. Science 164, 1290-1292

ANDREWS,P. (1967): Über den Blutchemismus des Flußkrebses Orconectes Limosus und seine Veränderungen im Laufe des Jahres .Z.vergl. Physiol. 57, 7-43

ARECHIGA, H., B. FUENTES , B.BARRERA and L.F.ABREU (1971): On the nature of circadian rhythm of activity in crayfish nervous system. Proceed. Int. Union Physiol. Sci. 9, 25.Intern.Congr. München 1971, 55

ASCHOFF,J. (1969): Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: Biological clocks. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 25, 11-28

BERGREEN,P.W., V.R.MEENAKSHI and B.T.SCHEER (1961): The oxidation of glucose by crustaceans. Comp. Biochem. Physiol. 2, 218-226

BLISS, D.M. (1962): Neuroendocrine control of locomotor activity in the land crab Gecarcinus lateralis.In H.HELLER, R.B.CLARK (Ed.): Neurosecretion. Proc.III Int. Symp. Neurosecr. 1961. London, New Yorck: Acad.Press, 391-408

BROWN,F.A., M.F.BENNETT and H.M.WEBB (1954a): Persistent daily and tidal rhythms of O_2-consumtion in fiddler crabs. J.Cell.Comp. Physiol. 44,477-506

BROWN,F.A., M.FINGERMAN and M.N.HINES (1954b): A study of the mechanism involved in shifting of the phases of endogenous daily rhythm by light stimulus. Biol. Bull. 106, 308-317

CARLISLE, D.B. and F.KNOWLES (1959): Endocrine control in the crustacea. Biol Rev. 31, 396-473

DEAN, J.M. and F.J. VERNBERG (1965): Variations in the blood glucose level of crustacean. Comp.Biochem. Physiol. 14,29-34

DEAN, J.M. and F.J. VERNBERG (1966): Hypothermia and blood of crabs. Comp. Biochem. Physiol. 17, 19-22

EDWARDS, G.A. (1950): The influence of eyestalk removal on the metabolism of the fiddler crab. Physiol. Comp. Oecol. 3, 34-50

ENRIGHT, J.T.(1965): Synchronisation and ranges of entrainment. In J.ASCHOFF (Ed.): Circadian clocks. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 112-124

FINGERMAN, M. (1970): Perspectives in crustacean endocrinology. Scienta 105, 1-23

FINGERMAN, M. and A.D. LAGO (1957): Endogenous twenty-four hour rhythms of locomotor activity and oxygen consumtion in the crayfish, Orconectes clypeatus. Am. Midland Natural. 58, 383-393

HUGGINS, A.K. and K.A. MUNDAY (1968): Crustacean metabolism. Adv. Comp. Physiol. Biochem. 3, 271-378

JANTZEN, H. (1967): Die Aktivitäten von Enzymen des Glycogen- und Trehalosestoffwechsels in den einzelnen Organen des Flußkrebses Orconectes limosus R. und Kontrollmechanismen des Glykogenstoffwechsels im Schwanzmuskel. Diss. FU Berlin

KALMUS, H. (1938): Das Aktogramm des Flußkrebses und seine Beeinflussung durch Organextrakte. Z. vergl. Physiol. 25, 798-802

KELLER, R. (1965): Über eine hormonale Kontrolle des Polysaccharidstoffwechsels beim Flußkrebs Cambarus affinis S. Z.vergl. Physiol. 51, 49-59

KELLER, R. (1966): Über eine hormonale Regulation der Glycogensynthese beim Flußkrebs Orconectes limosus R. (Cambarus affinis S.). Verh.Dtsch. Zool. Ges. Göttingen, Zool.Anz. Suppl. 30, 272-279

KELLER, R. (1968): Über Versuche zur Charakterisierung des diabetogenen Augenstielhormons des Flußkrebses Orconectes limosus R. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Innsbruck, Zool. Anz. Suppl. 32, 628-635

KENNEDY, D. (1963): Physiology of photoreceptor neurons in the abdominal nerve cord of the crayfish. J.Gen. Physiol. 46, 551-572

KLEINHOLZ, L.H. (1947): A method for the removal of the sinus gland from the eyestalk of crustaceans. Biol. Bull. 93, 52-55

KLEINHOLZ, L.H. (1966): Seperation and purification of crustacean eyestalk hormones. Am.Zool. 6, 161-167

KLEINHOLZ, L.H. (1966); V.J. HAVEL and R.REICHART (1950): Studies in the regulation of blood sugar concentration in crustaceans. II. Experimental hyperglycemia and the regulatory mechanism. Biol. Bull. 99, 454-468

KLEINHOLZ, L.H., F. KIMBALL and M.Mc CARVEY (1967): Initial characterisation and separation of hyperglycemic (diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk. Gen. Comp.Endocrin. 8, 75-81

MENAKER, M. (1968): Extraretinal light perception in the sparrow. I. Entrainment of the biological clock. Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington) 59, 414-421

NAGANO, T. (1951): Physiological studies on the pigmentary system of crustacean. VIII. The relation between the blood sugar values and the migration of the eye pigment in the shrimps. Sci. Rep. Tôhoku Imp. Univ. Sendai Ser. 4, Biol. 19, 118-123

NAYLOR, E. and B.G. WILLIAMS (1968): Effects of the eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in Carcinus.J.Exp. Biol. 49, 1o7-116

PAGE, T.L. and J.L. LARIMER (1972): Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. J. Comp. Physiol. 78, 1o7-12o

POWELL, B.L. (1965): The hormonal control of the tidal rhythm of locomotory activity in Carcinus maenas. Gen. Comp. Endocrin. 5, 7o5

PROSSER, C.L. (1934): Action potential in the nervous system in the crayfish. II. Responses to illumination of the eye and caudal ganglion. J. Cell. Comp. Physiol. 4, 363-377

ROBERTS, T.W. (1941): Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish Cambarus virilis H. Anat. Rec. Suppl. 8, 46-47

SACHS, L. (1968): Statistische Auswertungsmethoden. Berlin, Heidelberg, New Yorck: Springer Verl., 1. Auflage

SCHALLEK, W. (1942): Some mechanism controlling locomotor activity in the crayfish. J.Exp. Zool. 91, 155-166

SCHEER, B.T. (196o): The neuroendocrine system of arthropods. Vitamins and Hormons 18, 141-2o4

SCHULZ, N. (1925): Das Blut der wirbellosen Tiere, E. Crustaceen. In H. WINTERSTEIN (Hrsg.): Handbuch der vergl. Physiol. Bd.I 669-746

SCHWOCH, G. (1972): Some studies on biosythesis and function of trehalose in the crayfish Orconectes limosus R. Comp. Biochem. Physiol. 43 B, 9o5-917

UNDERWOOD, H. and M. MENAKER (197o): Extraretinal light perception: Entrainment of the biological clock controlling lizard locomotor activity. Science 17o, 19o-193

VAN HARREVELD, A. (1936): A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 34, 428-432

VERNET, G. (1969): Régéneration de cellules neurosécrétices et de la glande du sinus aprés ablation partielle du pédoncule oculaire chez Pachygrapsus marmoratus F. Ann. Endocrin. (Paris) 3o, 261-266

ZANDEE, D.I. (1966): Metabolism in the crayfish Astacus astacus L. II. The energyielding metabolism. Arch. Int. Physiol. Biochem. 74, 45-57

ZIMMERMANN, W.F. and T.H. GOLDSMITH (1971): Photosensivity of the circadian rhythm and of visual responses in carotenoid-depleted Drosophila. Science 171, 1167-1169

ZWICKY, K.T. (197o): Behavioral aspects of the extraocular ligth sense of Urodacus, a scorpion. Experienta 26, 747-748

Teil II:

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE HÄMOCYTENAGGREGATION BEI DER CRUSTACEEN-BLUTGERINNUNG

Einleitung

Die Blutgerinnung ist ein im Tierreich weit verbreiteter Mechanismus der Hämostase. Bei den Wirbeltieren ist sie ein in mehreren Stufen ablaufender, auf einer Reihe von Gewebs- und Plasmafaktoren beruhender Prozeß. Die bei der Gerinnung zuerst beobachtenden Veränderungen betreffen die Thrombocyten, die klebrig werden und aneinander bzw. an festen Oberflächen haften bleiben. Während die mit der daran anschliessenden Fibrinbildung zusammenhängenden Vorgänge relativ genau bekannt sind, sind die Vorstellungen über die Wirkmechanismen dieser primären Veränderungen an den Thrombozyten trotz zahlreicher Untersuchungen bisher noch weitgehend hypothetisch. (Übersichten: MICHAL u. FIRKIN, 1969; MUSTARD u. PACKHAM, 197o; u.a.)

Die ersten Beobachtungen über die Blutgerinnung an Crustaceen gehen in das 18. Jahrhundert zurück. In der Folge wies FREDERICQ (1879, zit. nach LECHLER u. GROSS, 1962) darauf hin, daß Koagulation des Plasmas (die nicht bei allen Species vorhanden sein muß; siehe MORRISON u. MORRISON, 1952) und Aggregation der Hämocyten zwei verschiedene Prozesse sind. Eine Reihe von widersprüchlichen Aussagen über die Wirkung von Inhibitoren und gerinnungsfördernden Faktoren bis in die neuere Zeit lassen sich darauf zurückführen, daß diese Differenzierung in 2 Phasen nicht immer genügend beachtet wurde.

Über den allgemeinen Ablauf der Gerinnung: Veränderungen der Blutzellen bzw. bestimmter Blutzelltypen bei Kontakt mit einer Wundfläche oder organismusfremden Oberflächen und anschließender Koagulation des Plasmas im Umkreis der Zellen, offensichtlich durch Freisetzung entsprechender Wirkfaktoren, herrschte schon durch die Arbeiten von HARDY (1892), LOEB (1910, beide zit. nach LECHLER/GROSS), TAIT u. GUNN (1917) u.a. weitgehend Klarheit. Zwar erschienen in der Folge zahlreiche weitere Arbeiten, die die Plasmakoagulation, das Crustaceen-"Fibrin" oder den Gerinnungsprozeß als Ganzes untersuchten, (Übersichten: SCHULZ 1925, GLAVIND 1948, LECHLER u. GROSS 1962), der Versuch einer eingenderen Analyse der mit der Aggregation der Hämocyten zusammenhängenden Faktoren und Mechanismen fehlt jedoch bis heute praktisch völlig, trotz der offensichtlichen Bedeutung der Zellaggregration sowohl als eigenständig wirkender Hämostase-Prozeß als auch als Auslöser der Plasmakoagulation (s.Übersichten).

In der vorliegenden Arbeit wird die als 1. Phase der Blutgerinnung bei den Crustaceen zu beobachtende Aggregation der Hämocyten untersucht. Es wird versucht:

1. die Zellaggregation auslösende bzw. für sie notwendige Faktoren aufzufinden und grob zu charakterisieren;
2. anhand der Wirkung verschiedener Reagenzien und Pharmaka auf die Aggregation erste Anhaltspunkte über den Mechanismus des Aggregationsvorganges zu erhalten.

Die auftretenden Fragestellungen und Probleme

sind denen der Thrombocytenaggregation ähnlich, die Literatur dazu lieferte zahlreiche Anregungen und wird im Verlaufe der Arbeit häufig zu Vergleichen herangezogen. Ebenso stehen die vorliegenden Untersuchungen im Zusammenhang mit dem allgemeinen Phänomen der Zellaggregation und des Zellkontaktes, wie es für Fragen von Entwicklung und Differenzierung in den verschiedensten Bereichen der Biologie von Bedeutung ist, und nehmen auf die dort erarbeiteten Hypothesen und Modelle für die Zellaggregation Bezug.
Dabei schien es sinnvoll, zuerst einmal mit verhältnismäßig einfachen, orientierenden Versuchen einen Überblick über den Gesamtmechanismus und die sich daraus ergebenden Fragestellungen anzustreben. Eine eingehendere Analyse der einzelnen Teilprobleme muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Material und Methoden

Tiermaterial

Flußkrebse (Astacus leptodactylus) wurden vom Handel bezogen und in Becken mit fließendem Wasser bei ca. 15°C und regelmäßiger Fleischfütterung gehalten.

Aggregationstest

Für die quantitative Messung der Aggregation der Hämocyten wurde ein photometrischer Test ausgearbeitet, der sich an das für die Thrombocyten-Aggregation verwandte Meßprinzip (BORN 1962) anlehnt:

In einer Halbmikroküvette (4mm Breite, 1o mm Schichtdicke) mit o,3 ml Probevolumen werden die Hämocyten durch Rühren mit zwei in die Flüssigkeit hineinragenden Edelstahl-Propellern zur Aggregation gebracht. Die Zellen bleiben am Rührer hängen, die Abnahme ihrer Zahl in der Flüssigkeit wird photometrisch gemessen und von einem Schreiber registriert. Die Messung erfolgte in einem Eppendorf-Photometer der Fa. Netheler & Hinz, mit angeschlossenem Kompensationschreiber bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die Rührpropeller wurden von einem auf die Küvette aufgestecktem Synchronmotor mit 11oo U/min angetrieben (die relativ hohe Umdrehungszahl ist nötig, um ein Sedimentieren der Blutzellen auf dem Küvettenboden möglichst klein zu halten; bei noch höheren Umdrehungszahlen werden die Zellen geschädigt).

Im Standardtest wurde dem Krebs die Gelenkhaut einer Extremität eingeritzt, o,1 ml

Hämolymphe mit einer Plastikpipette entnommen, in der Küvette mit o,2 ml Van Harreveld - Blutersatzflüssigkeit (VAN HARREVELD 1936, mod. nach ANDREWS 1967) bzw. derselben Menge einer Lösung der zu testenden Substanz in Harreveld gemischt und sofort der Rührer aufgesetzt. Aus jeder Extremität wurde nur einmal Hämolymphe entnommen.

In der vorliegenden Arbeit wird als Parameter für die Aggregation die Aggregationsgeschwindigkeit (V_A) benutzt.
Als Maß für V_A wurde $1/T_{50}$ gewählt, wobei T_{50} die Zeit von der Hämolymphentnahme bis zu 50% der Transmissionsänderung ist. Bei vollständiger Hemmung der Aggregation liegt T_{50}, infolge des Sedimentierens der Zellen, maximal bei 20 Minuten, entsprechend einem V_A von o,o5; die niedrigsten Werte für T_{50} liegen bei o,3 Minuten (entsprechend einem V_A von 3,3), der Zeit, die im wesentlichen für Blutentnahme, Einfüllen und Aufsetzen des Rührers benötigt wird. Für die Tests wurden in der Regel nur Tiere verwandt, deren Zelltiter ausreichend (ca. 10^6 Zellen/ml) war und deren Normal-V_A im Bereich des statistischen Mittels der Meßserie ($\bar{x} \pm$ Standardabweichung s) lag. Die Werte für V_A sind relativ unabhängig vom (individuell und zeitlich stark schwankenden) Zelltiter der Hämolymphproben, im Vergleich zu unverdünnter Hämolymphe (V_A=1,6) ist der Aggregationsvorgang allerdings, bei prinzipiell gleichem Verlauf, im Standardtest mit 1:3 verdünnter Hämolymphe etwas verlangsamt (V_A = 1,25). Die Aggregation der Zellen ist praktisch vollständig, nur wenige Zellen

zeigen keine Neigung zur Adhäsion. Ob ihnen ein besonderer Zelltyp entspricht, wurde nicht untersucht. Eine durch die Oxydation des Hämocyanins hervorgerufene Absorbtionsänderung bleibt innerhalb der Ablesefehler und kann vernachlässigt werden. Fig. 1 zeigt Registrierungen mit normaler, vollständig gehemmter und beschleunigter Aggregation.

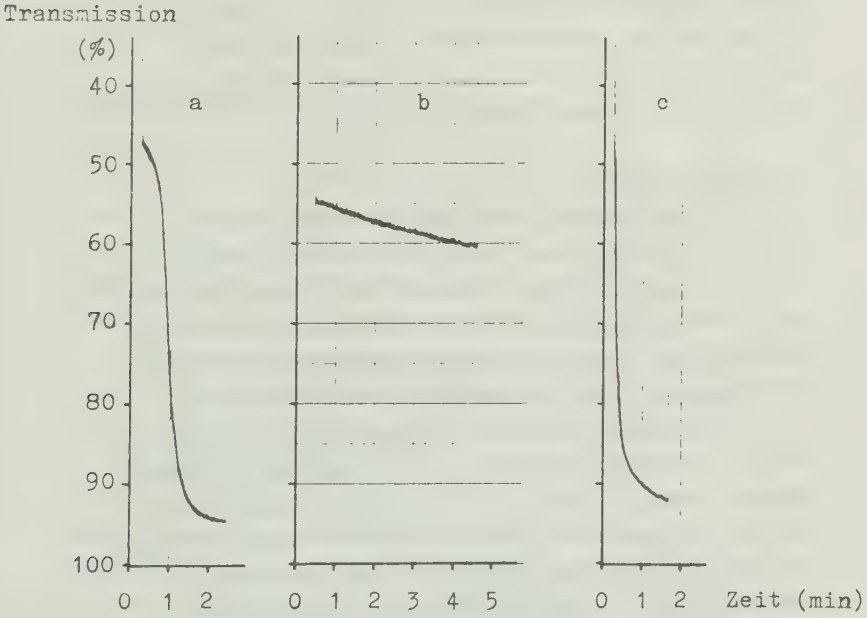


Fig. 1 Registrierungen des Aggregationsverlaufs im Standardtest.
a) ohne Zusätze
b) vollständig gehemmt durch Chlorpromazin 0,5 mM (langsamer Anstieg der Transmission durch Sedimentation der Blutzellen bedingt)
c) beschleunigt durch Hypodermislipid (90 µg/ml, Fraktion 3)

Zu testende Substanzen wurden in van Harreveld-Saline gelöst bzw., bei Unlöslichkeit, mit Hilfe von Ultraschall suspendiert; in jedem Falle wurde die Lösung auf ihren pH (Sollwert: 7,5) kontrolliert. Rührer und Küvetten wurden nach jeder Messung mit konzentrierter alkalischer Hypochlorit-Lösung ("Antiformin") und anschließendem sorgfältigem Abspülen gereinigt.
Zur Messung der pH-Abhängigkeit der Aggregation wurde die Konzentration der Pufferionen (Tris-Maleat-Puffer nach ANDREWS (1967)) im Ansatz - bei entsprechender Verminderung des Na Cl-gehaltes - um 2/3 erhöht. Die pH-Bestimmung erfolgte nach Messung der Aggregation.

Gewinnung gewaschener Hämocyten

Die für die Prüfung auf Hämolymph-Faktoren benötigten gewaschenen Hämocyten-Suspensionen wurden in folgender Weise hergestellt: Nach Kühlung der Krebse in Eiswasser (Zur Verlangsamung der Aggregation) wurden 2-3 ml Hämolymphe mit einer Plastikpipette aus dem Pericard entnommen, mit 12 ml eisgekühlter Tween 8o-Lösung (1,3 %ig in Harrev.-Lösung) gemischt, bei langsamer Geschwindigkeit abzentrifugiert, noch einmal mit derselben Lösung und anschließend einmal mit Harreveld-Saline mit 3% Polyvinylpyrollidon gewaschen, schließlich in 1 ml Harreveld + 3% PVP suspendiert und bis zum Test bei $0^{o}C$ aufbewahrt.

Aufarbeitung der Gewebsfaktoren

a) Rohlipid wurde vereinfacht nach FOLCH (1957) gewonnen: 1 Teil Gewebe wurde in 2o Teilen Chloroform/Methanol 2:1 homogenisiert, filtriert und mit o,2 Teilen Wasser geschüttelt, die Chloroform-Phase unter Stickstoff eingedampft. Die weitere Auftrennung erfolgte dünnschicht-

chromatographisch nach SKIPSKI et al. (1965) auf Kieselgel mit Diisopropyläther-Eisessig 94:4 und Petroläther-Diäthyläther-Eisessig 90:10:1 als Laufmittel. Eluiert wurde nach COLLATZ (1969) mit Chloroform-Methanol-Aceton-Wasser 1:1:1:0,5. Mengenbestimmungen erfolgten gravimetrisch.

b) Acetontrockenpulver aus Hypodermis-Gewebe: 250 mg Hypodermisgewebe von verschiedenen Stellen des Carapax wurde mit 1 ml kaltem Aceton homogenisiert, der Rückstand 8 x mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Aufarbeitung der Hämocytenfaktoren

a) Aceton-Extraktion der Blutzellen:
Aus ca. 2 ml Hämolymphe wurden die Zellen abzentrifugiert (1 Min. bei 12000 g in einer Eppendorf-Mikroliterzentrifuge), in einem Glashomogenisator nach DOUNCE mit 1 ml eisgekühltem Aceton homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand im Rotavapor eingedampft (Acetonextrakt). Der Niederschlag wurde 6 x mit Aceton gewaschen und im Vacuum getrocknet. (Acetontrockenpulver). Das Trockenpulver wurde mit Harreveld-Saline extrahiert und der Extrakt vor Gebrauch zentrifugiert. Dialyse dieses Materials wurde in einem Visking-Dialyseschlauch bei Zimmertemperatur ausgeführt. Nach 6-stündiger Dialyse gegen die 2-fache Menge Harreveld zur Gewinnung des dialysablen Anteils wurde weitere 18 Stunden gegen mehrfach gewechselte Harreveld-Saline dialysiert.

b) Chloroform/Methanol-Extraktion der Blutzellen Gleiches Vorgehen wie bei der Aceton-Extraktion, anstelle des Acetons jedoch Chloroform/Methanol 2:1

Ergebnisse

1. Nachweis verschiedener Aggregationsfaktoren

a) Es konnten 2 verschiedene, die Aggregation der Hämocyten beschleunigende Faktoren nachgewiesen werden: ein Lipidfaktor im Gewebe (in geringem Maße auch in den Blutzellen) und ein wasserlöslicher, nicht dialysabler Faktor in den Blutzellen;
b) die Hämocyten benötigen zur Aggregation offensichtlich einen plasmatischen Cofaktor.

Zu a) Tabelle 1 zeigt die Wirkung verschiedener Präparationen im Standardtest. Aus Homogenaten von Hypodermis oder Mitteldarmdrüse und Herz (letztere Organe wurden ausnahmsweise einer anderen Flußkrebsart, Orconectes limosus, entnommen) ließ sich ein Lipid extrahieren, das schon in geringen Mengen eine starke Beschleunigung des Aggregationsvorganges, hauptsächlich durch Verkürzung bzw. Wegfall der Lag-Phase zu Beginn der Aggregation, bewirkt.
Fig. 2 zeigt die dünnschichtchromatische Auftrennung des Hypodermis-Lipids. Wirksames Material ist hauptsächlich in Franktion 3 zu finden. In dieser Bande laufen die Sterine (vergl. COLLATZ 1969). Aus ihr eluiertes Material hat noch in einer Menge von 1o µg/ml einen beschleunigenden Effekt. Der Rohextrakt Orconectes-Mitteldarmsdrüse und Herz war, evtl. aufgrund schonender Behandlung, noch erheblich aktiver, schon bei 5 µg/ml ergab das ungereinigte Lipid eine deutliche Wirkung. Geht man von einem 2o%igem Anteil von Fraktion 3 am Gesamtlipid aus, und unterstellt auch für dieses Material die Konzentration der Aktivität

Präparation		50%ige Beschleunigung bei folgender Konzentration: (interpoliert)
Hypodermis-Lipid, gereinigt (Fraktion 3)		30 µg/ml
Hypodermis-Acetontrockenpulv.		1000 µg/ml
Rohlipid aus Mitteldarmdrüse + Herz (Orconectes)		8 µg/ml
Hämocyten	Acetontrockenpulver	12 µg/ml [1]
	Acetontrockpv.,dialysabler Anteil	keine Beschleunigung feststellbar (bei einer 170 µg/ml Trockpv. entsprechend.Konz.)
	Acetontrockpv.,nichtdialysabler Anteil	(entsprechend 200 µg/ml Trockenpulver)
	Acetontrockpv.,2 min bei 100°C	12 µg/ml
	Acetonextrakt	80 µg/ml
	Chloroform/Methanol-Trockpv.	300 µg/ml
	Chloroform/Methanol-Extrakt	bei 30 µg/ml keine Beschleunigung feststellbar (V_A= 1,1)

Tab. 1 Wirkung verschiedener Gewebs-und Hämocytenfraktionen auf die Aggregation

Kontrollen: ($\bar{x} \pm s$) $V_A = 1,0 \pm 0,05$ (n= 6)

Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration im Ansatz.

Anm.[1]: entspricht dem Gehalt von 40 µl Hämolymphe

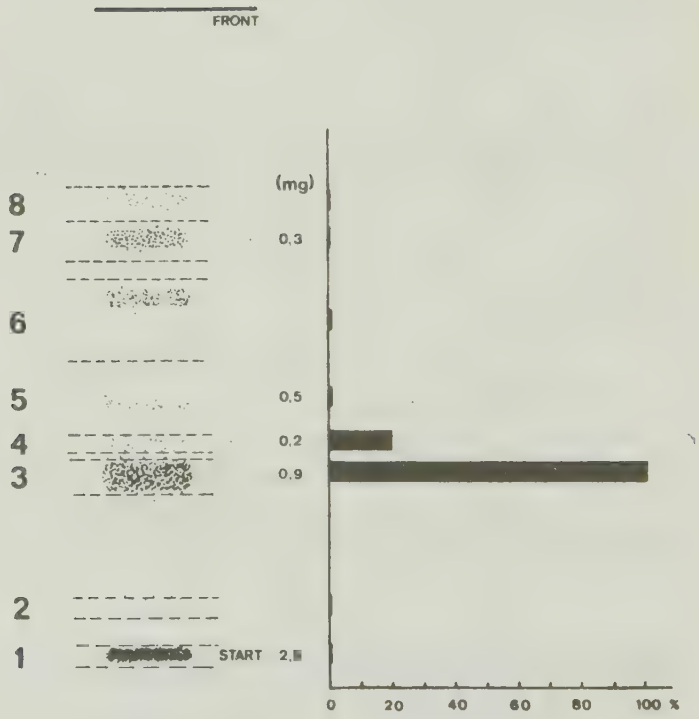


Fig. 2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Hypodermis-Lipids.
Lage der einzelnen Fraktionen, Menge des eluierten Lipids und aggregationsbeschleunigende Wirkung der einzelnen Fraktionen, in % von Fraktion 3.

auf die gleiche Bande, so muß der Gewebsfaktor mindestens schon in Konzentrationen von 1 µg/ml (entsprechend $2 \cdot 10^{-6}$ M bei einem angenommenen Mol.-Gew. von 500)die Aggregation beschleunigen.
Die acetonunlösliche Präparation aus Hypodermisgewebe (Acetontrockenpulver) enthält dagegen nur eine geringe aggregationsbeschleunigende Aktivität.
In den Hämocyten liegt ein umgekehrtes Verhältnis vor: während in der acetonlöslichen Fraktion (Aceton- oder Chloroform/Methanol-Extrakt) relativ wenig Aktivität enthalten ist, zeigt der acetonunlösliche Teil eine stark beschleunigende Wirkung. Dieser Hämocytenfaktor ist nicht dialysabel, verliert allerdings bei der Dialyse stark an Aktivität. Durch Chloroform/Methanol-Behandlung wird er zerstört, nicht jedoch durch 2-minütiges Erhitzen auf 100°C.

Ob die geringfügige aggregationsbeschleunigende Aktivität in der Lipidfraktion der Hämocyten und im Acetontrockenpulver aus Hypodermisgewebe auf weitere Faktoren hinweist, ob es sich um die gleichen wie in den hochaktiven Präparationen handelt oder ob unspezifische Effekte vorliegen, kann nicht entschieden werden.

Zu b): Durch Waschen mit einer Lösung des AggregationshemmersTween 80 läßt sich eine Hämocytensuspension gewinnen, in der die Zellen nicht bzw. nur sehr langsam aggregieren. Während Lipidextrakt aus Gewebe und Acetontrockenpulver aus Hämocyten keine Wirkung zeigen, stellt eine Zugabe von Hämolymphplasma die Aggregationsfähigkeit wieder her. (Fig. 3).

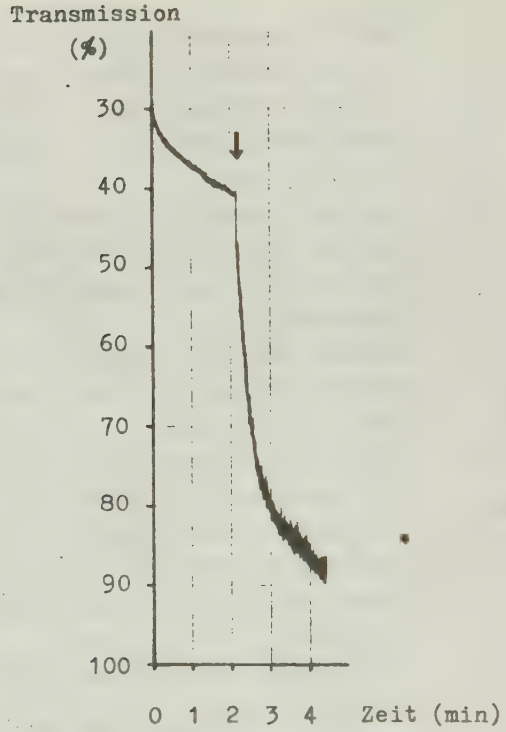


Fig. 3
Aggregation gewaschener Zellen.
0,3 ml Zellsuspension.
Bei ↓ Zugabe von
0,1 ml Plasma

Der Plasmafaktor ist nicht dialysabel und im Gegensatz zum Hämocytenfaktor hitzelabil. Allerdings bleibt auch nach dem Erhitzen und im Dialysat eine gewisse Restaktivität vorhanden, die evtl. als unspezifischer Effekt anderer Substanzen zu erklären ist; ähnlich bewirkt auch Rinderserumalbumin eine schwache Aggregation der Hämocyten. In Tab. 2 ist die Aggregationsgeschwindigkeit der Zellen in verschiedenen Ansätzen aufgeführt.

2. Einfluß verschiedener Substanzen und des pH auf die Aggregation

Tab. 3 zeigt die Wirkung einer Reihe von Reagenzien und Pharmaka im Standardtest, von denen bekannt ist, daß sie die Blutgerinnung bei

Zusätze	Konzentration	Aggregationsgeschwindigkeit (V_A)
—— (Harreveld-Lösung)	-	0,21 ± 0,07 (n=3)
Plasma (unbehandelt)	25%	1,9 ± 0,6 (n=4)
Plasma erhitzt: 2 min 100°C	25%	0,6
" " "	33%	0,8
" " 80°C	33%	0,8
Plasma, dialysabler Anteil [1]	entsprechend 17%	0,6
Plasma, nicht dialysabler Anteil [2]	33%	2,5
	25%	2,0
Rinderserumalbumin	1%	0,4 0,3
Hämocyten-Acetontrockenpulver	entsprechend d.Zellgehalt von 25% Hämolymphe	0,3
Hypodermis-Rohlipid	50 µg/ml	0,2

Tab. 2 Aggregation gewaschener Hämocyten

Anm. [1]: 9 Std. gegen gleiches Volumen Harreveld dialysiert

" [2]: 24 Std. gegen mehrfach gewechselte Harreveld-Lös. dialysiert

Substanz	Stoffgruppe bzw. hauptsächlichst. Angriffspunkt	keine Hemmung ($V_A = \bar{x} \pm 2s$) bei:	50%ige Hemmung bei: (interpol.)	Bemerkungen
EDTA	Chelat-Bildner	25 mM		(in isoton. NaCl-Lösung)
2,4-Dinitrophenol	hemmt oxydative Phosphorylierung	5 mM		
cAMP	Nucleotid	10 mM		
ADP	"	10 mM		
ATP	"	10 mM		
Kokain	Anästhetikum		5 mM	
Chlorpromazin	"		0,12 mM	
Imipramin	"		0,2 mM	
Acetylsalicyls.		10 mM		
Chloroform	hämolytisch			50%ige Beschleunigung bei ca. 10 mM
Digitonin	"			50%ige Beschleunigung bei 0,2 mM
Jodacetat	SH-Gruppen	10 mM		
p-Chlormercuribenzoat	"	0,25 mM		
p-Chlormercuribenzosulfonat	"	(2,5 mM)		schwach gehemmt (V_A= 0,94 bei 2,5 mM)
Quecksilberchlorid	"		0,25 mM	Bei Zugabe v. 50 mM Cystein zu d. mit 1 mM $HgCl_2$ inhibiert Ansatz setzt nach 2 min Aggreg ein (mit einem V_A von 0,7)
N-Äthylmaleinimid	"		(0,5 mM)	verspätet einsetzende, dann jedoch vollständige Hemmung
Suramin	basische Gruppen		0,1 mM	
Trinitrobenzolsulfonsäure	NH_2-Gruppen	10 mM		wegen Farbreaktion nur qualitativ bestimmbar

Perjodat	Kohlenhydrat	(5 mM)		(in isoton.NaCl-Lös.) Weg.Ausfall v.KJO_4 nicht exakt best.
Dithioerythrit	Thiol;reduzierend		2,5 mM	
Cystein	" "	50 mM		
Glutathion (red.)	" "	50 mM		bei 100 mM leicht gehemmt (V_A = 0,7)
Harnstoff	H-Brück.,hydrophobe u.Ionen-Bind.	500 mM		
Guanidin-HCl	"	90 mM		
Pronase	Protease		0,15 mg/ml	maximale Hemmung (V_A=0,14) bei 1 mg/ml; bei 20 mg/ml wieder schnellere Aggreg. (V_A=0,25)
N-Acetylneuramins.		15 mM		
Tween 80	nichtionisches Detergens		0,25 mM	
Heparin		2000 E/ml		
Rind.serumalbumin		2%		
Polyvinylpyrrolidon (PVP)		2%		
Paraffinöl		80 µg/ml[1)]		
Linolsäure				leichte Beschleunigung (V_A= 1,8 bei 1 mM[1)])
Cholesterin	Steroid	Ergebnisse nicht reproduzierbar		
Cholsäure	"	2 mM[1)]		

Tab. 3 Einfluß verschiedener Substanzen auf die Aggregation

Kontrollen dazu: $V_A = 1,26 \pm 0,15$ (n = 19).
Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration.
Zugrunde liegen wenigstens 2, bei Substanzen, für die 50%ige Hemmung bzw. Beschleunigung angegeben wird, wenigstens 3 Bestimmungen.
Anm. [1)]: als Emulsion bzw. Suspension

Arthropoden hemmen, die Thrombocytenaggregation beeinflussen, gruppenspezifische Inhibitoren sind oder von denen aus sonstigen Gründen die Untersuchung ihrer Wirkung auf die Hämocytenaggregation interessant schien.

Die Aggregation der Blutzellen findet nur in einem engeren pH-Bereich statt; die Abhängigkeit der Aggregationsgeschwindigkeit vom pH zeigt Fig. 4.

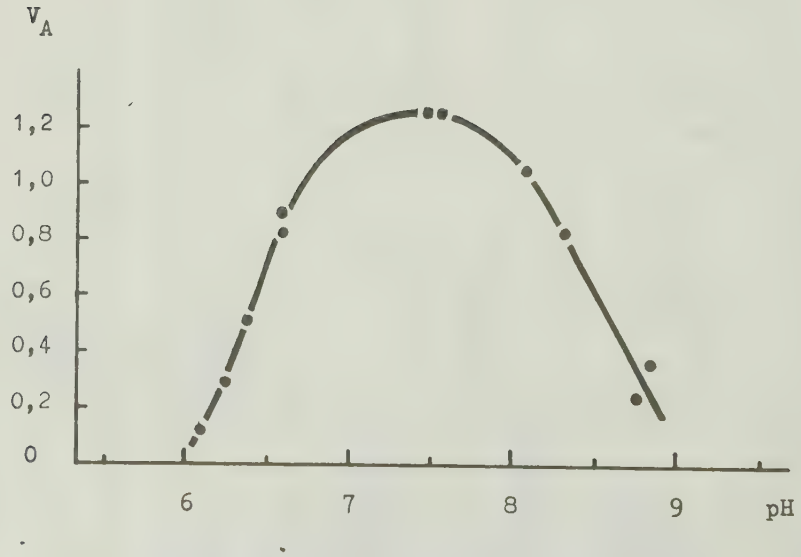


Fig. 4 pH-Abhängigkeit der Hämocytenaggregation

Diskussion

Das Wesen der Zellaggregation im Gerinnungsprozeß der Crustaceen besteht in der Fähigkeit der Hämocyten, aus einem Zustand geringer Klebrigkeit heraus, in den sie frei in der Hämolymphe schwimmen, durch physikalische oder chemische Stimuli, hauptsächlich im Zusammenhang mit einer Verletzung, sehr schnell Eigenschaften zu bekommen, die sie fest aneinander und an vorhandenen Oberflächen haften lassen.
Die Frage nach dem Mechanismus dieses Prozesses läßt sich grob wie folgt aufgliedern:

1. Welche Faktoren wirken auslösend?
2. Welche Veränderungen finden an der Zelle statt?
3. Welche molekularen Vorgänge liegen der Aggregation zugrunde?

1. Auslösende Faktoren

Die rasch eintretende Adhäsion und morphologische Veränderung der Hämocyten bei Kontakt mit Glas usw., und die konservierende Wirkung hydrophober Oberflächen auf Wirbeltierblut führten die meisten Autoren, die sich mit dieser Frage beschäftigten, zu der Annahme, daß mechanische Reizung bzw. der Kontakt mit körperfremden Oberflächen die Aggregation auslöst (Übersichten: TAIT u. GUNN, 1917; SCHULZ, 1925). Bei Crustaceen jedoch kann die Aggregation auch durch Auffangen der Hämolymphe in eingefetteten Gefäßen usw. nicht aufgehalten werden, sondern nur mit extremen Vorsichtsmaßregeln wie Auffangen unter Paraffinöl (TAIT u. GUNN 1917). GREGOIRE (1953) konnte bei Insekten keinen Einfluß von verschiedenen Oberflächen mehr oder minder hydrophoben Charakters auf die Hämolymphkoagulation feststellen. Auf die Möglichkeit einer chemischen

Auslösung machte BANG (1971) mit seinem Befund an Carcinus aufmerksam, der in mit Hämocyten-extrakt behandelten Injektionsspritzen eine schnelle Aggregation der Zellen feststellte, während in frischen oder ausgekochten Spritzen die Zellen deutlich länger unverändert blieben.

Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß in Blutzellen und Gewebe der Krebse Faktoren vorhanden sind, die eine rapide Aggregation der Hämocyten veranlassen.
Gewebs- und Hämocytenfaktor wirken schon in so niedrigen Konzentrationen, daß bei Verletzung des Tieres die Freisetzung eines dieser Faktoren, etwa aus geschädigten Gewebszellen, für die Auslösung des Gerinnungsprozesses zumindest mitverantwortlich sein dürfte.
Die dünnschichtchromatische Auftrennung des im Gewebe enthaltenen Lipids zeigt, daß die Wirkung auf einem spezifischen Faktor beruht. Dabei überrascht, daß er offenbar nicht zu den Phospholipiden gehört, die z.T. bei der Wirbeltierblutgerinnung eine Rolle spielen (SEEGERS, 1971). Eine Testung von kristallisiertem Cholesterin ergab keine Klarheit darüber, ob es ggfs. mit dem Faktor identisch ist, da, evtl. aufgrund der Schwierigkeit, es in feinverteilter Form zu suspendieren, widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden und beschleunigende Wirkungen nicht reproduziert werden konnten. Die nahe verwandte Cholsäure zeigte keinen Effekt.
Daß der in den Hämocyten enthaltene beschleunigende Faktor nicht dialysabel ist, findet

ebenfalls keine Parallele bei der Blutgerinnung der Vertebraten; der funktionell wahrscheinlich vergleichbare Stoff ist bei den Thrombocyten das ADP. ADP hat bei den Crustaceen-Hämocyten, ebenso wie ATP oder cycl. AMP, keinerlei Wirkung auf die Aggregation.

2. Veränderungen an den Hämocyten

Zwar waren die raschen Formveränderungen der Blutzellen nach Entnahme der Hämolymphe und Kontakt mit Glas usw. schon den ersten Untersuchern bekannt, darüberhinaus sind jedoch die die Aggregation einleitenden Veränderungen, insbesondere an Zellmembran und Zelloberfläche, weitgehend unklar. Hier interessiert insbesondere auch die Frage, ob eine Ausschüttung von Zellmaterial stattfindet.
Bisherige Versuche, die Ausschüttung von Zellmaterial zu Beginn des Gerinnungsvorganges elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen, lieferten keine eindeutigen Ergebnisse; STANG-VOSS (1971) beschreibt zwar eine Ausschleusung von Zellmaterial bei Astacus - Hämocyten, macht jedoch keine Angaben über den Zeitpunkt des Vorganges. KÜMMEL (mdl. Mitteilung) konnte in noch nicht abgeschlossenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Blutzellen der gleichen Art bisher weder typische Exocytosestadien, die mit einer Ausschleusung von Granula in Beziehung gebracht werden können, noch einen Zerfall oder eine Perforation der Hämocytenmembran sehen. Andererseits sind Löcher in der Zellwand, die für den Durchtritt nicht zu großer Makromoleküle gerade weit genüg sind, im Schnittbild

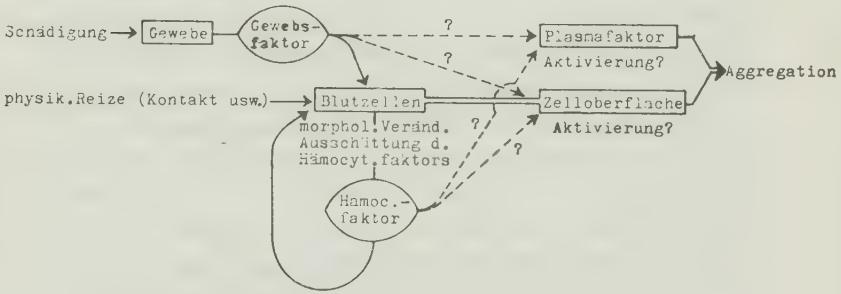
nur schwer darzustellen, wie SEEMAN et al. (1973) es an bestimmten Fällen der Erythrocyten-Hämolyse deutlich machten.
Demgegenüber gibt es einige indirekte Hinweise, zumindest für eine Änderung der Zellwandpermeabilität: HOFFMANN u. STOECKEL (1968), die ebenso wie frühere Autoren (Übersicht: GREGOIRE 1962) den Austritt von Zellmaterial als Ursache der Plasmakoagulation ("Fibrin"-Bildung) annehmen, fanden bei bestimmten Blutzelltypen (den "Koagulocyten") der Heuschrecke Locusta ein Anschwellen der ergastoplasmatischen Zisternen und allgemeines Imbibieren des Hyaloplasmas bei äußerlich intakter Zellmembran, das auf Veränderungen der Zellwandpermeabilität schliessen lasse. BELDEN u. COWDEN (1971) stellten an Schaben-Hämocyten fest, daß ein Plasma-Fluoreszenzfarbstoff das Cytoplasma der Koagulocyten schnell markiert, während er in die anderen Zelltypen, die im Koagulationsprozeß kaum Veränderungen durchlaufen, nur sehr langsam eindringt. Sie werten diesen Befund als einen Hinweis auf rasche Veränderungen an der Hämocytenmembran.
Bei Wirbeltierthrombocyten ist die mit der Aggregation der Plättchen verbundene "release"-Reaktion bekannt, bei der ADP ausgeschüttet wird. Sie wird durch eine ganze Reihe verschiedenster Stimuli, wie mechanische Reize, Collagen, Serotonin, Thrombin u.v.a. ausgelöst, wobei freigesetztes ADP zu einer Aggregation der Plättchen führt. Wichtig dabei ist, daß das ADP selbst in der Lage ist, eine Ausschüttungsreaktion hervorzufrufen. Die anderen Faktoren wirken

auf die Aggregation offensichtlich nur indirekt, über das ADP, das sich infolge der Freisetzung aus stimulierten Plättchen im Plasma bzw. in entstehenden Aggregaten ansammelt und damit eine Selbstbeschleunigung des Aggregationsvorganges bewirkt, wenn es nicht schnell genug enzymatisch abgebaut wird (Übersichten: MICHAL u. FIRKIN, 1969; MUSTARD u. PACKHAM, 197o; ausserdem MASSINI u. LÜSCHER, 1972).
Zwar fehlt bisher der direkte Nachweis, verschiedene Beobachtungen legen jedoch nahe, daß es sich bei der Aggregation der Crustaceen-Hämocyten um einen ähnlichen Prozeß handelt:

a) Die Menge an Hämocytenfaktor, die in den Zellen eines Volumenteils Hämolymphe enthalten ist, bewirkt noch in dem 25-fachen Volumen Hämolymphe eine erhebliche Aktivierung der Hämocytenaggregation;
b) Anästhetika, wie Chlorpromazin und Imipramin, die bei Wirbeltierzellen die Zellmembran stabilisieren, d.h. vor osmotischbedingter Hämolyse und Zerfall von Zellorganellen schützen, den Durchtritt von Ionen und spezifischen Substanzen durch die Zellmembran hemmen u.a. (Übersicht: SEEMAN 1966), verhindern auch die Aggregation der Hämocyten des Flußkrebses;
c) umgekehrt führen Reagenzien, die bei Erythrocyten Hämolyse bewirken (Digitonin, Chloroform in höheren Konzentrationen), zu einer starken Beschleunigung der Aggregation, vermutlich durch Freisetzung des Hämocytenfaktors. Dieser Effekt ist allerdings mit der ADP-Ausschüttung der Thrombocyten nicht direkt ver-

gleichbar, da diese normalerweise selektiv ist, andere Zellbestandteile werden nicht mit ausgeschüttet. Inwiefern dies auch für den physiologischen Ablauf der Hämocytenaggregation gilt, ist nicht bekannt.
Diese Beobachtungen lassen sich am zwanglosesten mit der Annahme erklären, daß die Aktivierung der Hämocyten durch den Gewebsfaktor oder durch physikalische Reize wie mechanischen Stress, Kontakt usw. zuerst zu einer Permeabilitätsänderung der Hämocytenmembran und zum Austritt des (evtl. der) Hämocytenfaktors (-en) führt, der den Prozeß bei weiteren Zellen in Gang setzt und so autokatalytisch die Gerinnung beschleunigt. Dabei ist noch unklar, 1) ober der Gewebsfaktor alleine schon die Aggregation auslösen kann, 2) ob zusätzlich die Ausschüttung des Hämocytenfaktors notwendig ist und ob schließlich 3) die zur Aggregation führenden Veränderungen an der Zelloberfläche stattfinden oder ob sie durch Reaktion der Aggregationsfaktoren mit dem Plasmafaktor bewirkt werden.
In diesem Zusammenhang wäre auch die Frage zu stellen, ob die Aggregation der Zellen miteinander von der Klebrigkeit gegenüber fremden Oberflächen verschieden ist, wie es COMAN (1961) für Säugerzellen feststellte. Etwaige Unterschiede wurden hier nicht berücksichtigt, bei der verwandten Meßtechnik dürfte v.a. die interzelluläre Adhäsion eine Rolle spielen, da die kleinen Rührpropeller schon bald nach Aggregationsbeginn mit Hämocyten bedeckt sind.

Der Anschaulichkeit halber seien abschließend noch einmal die hypothetischen Zusammenhänge der einzelnen Faktoren in einem vorläufigen Schema zusammengestellt:



Nicht eingezeichnet wurde die Freisetzung von Faktoren, die die anschließende Koagulation des Plasmas hervorrufen.
Bisher nicht nachgewiesen, aber theoretisch zu fordern wäre ein (Hämolymph-?) System, das die freigesetzten aggregationsauslösenden Faktoren neutralisiert oder zerstört, da andernfalls aufgrund des selbstbeschleunigenden Effekts lokale Verletzungen zu einer Gerinnung des gesamten Hämolymphvolumens führen müßten, was nicht der Fall ist.

3. Molekularer Mechanismus der Aggregation

Aggregation und Adhäsion sind weitverbreitete biologische Phänomene und es hat nicht an Versuchen gefehlt, die beteiligen Mechanismen auf-

zuklären. Bevorzugte Objekte waren dabei künstlich dissoziierte Schwamm-Zellen, Myxomyceten und verschiedenste Zelltypen aus mechanisch oder chemisch dissoziiertem Vertebraten-Gewebe oder Zellkulturen, einschließlich Tumor-Zellen. Dennoch ist bisher in keinem Fall eine befriedigende Aufhellung der molekularen Mechanismen und der beteiligten biophysikalischen Kräfte gelungen.
Für die Verhältnisse bei der Aggregation der Crustaceen-Hämocyten kann es daher vorerst nur darum gehen, die vorhandenen Daten mit anderen Objekten gewonnen Befunden und Hypothesen zu vergleichen.
Für die Aggregation dissoziierter Schwamm-Zellen konnte MOSCONA (1968) nachweisen, daß ein (spezies-spezifisches) Glycoproteid die Zellen agglutiniert, indem es sich durch Kreuzbindung miteinander und mit der Zelloberfläche bindet.

Ähnliche Vorgänge finden sich bei Vertebraten-Zellen (LILIEN 1969) und der Aggregation des Schleimpilzes Dictyostelium (GERISCH 1968).

Am Aggregationsvorgang beteiligtes extrazelluläres Material wird jedoch nicht nur bei art- oder gewebsspezifischen Zellkontakten beschrieben, für die es unter Annahme ähnlicher Mechanismen, wie sie für die Antigen-Antikörper-Reaktion eine Rolle spielen, einleuchtende Modelle liefert. Auch die Aggregation der Thrombocyten bedarf eines plasmatischen Cofaktors, der wahrscheinlich das Fibrinogen ist (VERMYLEN et al. 1971). Ebenso spielt bei Kontakten und Adhäsion von Zellen mit den verschiedensten Ober-

flächen, wie BAIER (1970) und TAYLOR (1970) betonen, extrazelluläres Material in Form von Oberflächen-adsorbierten Proteinschichten eine wichtige Rolle.
Diese Beispiele zeigen, daß eine durch extrazelluläre Cofaktoren vermittelte Aggregation die Regel zu sein scheint. Der vorläufige Nachweis eines Plasmafaktors in der Hämolymphe, der für die Aggregation der Hämocyten notwendig ist, zeigt, daß dies auch für die Zellaggregation bei der Crustaceen-Blutgerinnung gilt. Eine Nachprüfung des Ergebnisses mit einem anderen Aggregationsinhibitor wäre jedoch noch wünschenswert, um die Möglichkeit auszuschließen, daß der Plasma-Effekt unspezifisch ist und auf eine Schädigung der Zelloberfläche zurückzuführen ist, die möglicherweise beim Waschen mit dem Detergens Tween auftritt. Die sehr viel stärkere Wirkung, die der makromolekulare Anteil des Plasmas im Vergleich zu - wahrscheinlich unspezifisch wirkendem - Rinderserumalbumin und dem dialysablen und hitzestabilen Anteil des Plasmas ausübt, läßt eine solche Möglichkeit jedoch nicht sehr plausibel erscheinen. Die spontane Aggregation mit Kokain gewaschener Hämocyten bei Suspension in reiner NaCl-Lösung, die DAMBOVICEANU (1932) bei Astacus fand, und die im Gegensatz zu den eigenen Experimenten steht, könnten auf einer nicht vollständigen Entfernung der Plasmaproteine beruhen; genaue Angaben über die Waschprozedur fehlen leider. Als eine Stütze der Annahme einer physiologischen Funktion des Plasmafaktors ist schließlich

auch der Befund von MORRISON u. ROTHMAN (1957) anzusehen, die Formalin-fixierte Limulus-Hämocyten durch Zugabe von Plasma der eigenen Art (nicht jedoch fremden Plasmas) zur Aggregation bringen konnten.

Die einfachste Vorstellung des Mechanismus der Hämocyten-Aggregation auf der Basis der bisherigen Befunde wäre das Modell einer Brückenbildung durch den Plasmafaktor, der die Zellen, ähnlich wie ein Hämagglutinin, aneinanderbinden würde. Ob die Einleitung des Vorganges durch eine Aktivierung des Plasmafaktors oder der spezifischen Kontaktbereiche auf der Zelloberfläche stattfindet, muß dabei offen bleiben. Außer der Brückenbildung sind auch andere Wirmöglichkeiten für den extrazellulären Faktor denkbar, wie sie z.B. MOSCONA (1968) für die Verhältnisse bei der Schwamm-Zellen-Aggregation erörtert, doch erfordert eine eingehende Diskussion weitere Informationen über den Aggregationsvorgang.

Bermerkenswert ist jedoch, daß Calcium-Entzug mit EDTA im Gegensatz zu den meisten anderen Aggregationsvorgängen die Hämocytenaggregation nicht stört, die Bindungen also offensichtlich ohne eine zusätzlich Brückenfunktion divalenter Kationen funktionieren und Calcium- oder andere 2-wertige Ionen auch nicht für die Bindung von Rezeptorgruppen bzw. Liganden auf der Zelloberfläche, wie es etwa bei den Schwamm-Zellen der Fall ist (MOSCONA 1968), notwendig sind.

Im Gegensatz zu den Aggregationsvorgängen bei Dictostelium und dissoziierten Schwamm- oder Vertebratenzellen ist offensichtlich bei der Hämocytenaggregation kein Kohlenhydrat an den aktiven Gruppen des extrazellulären Faktors und auch nicht der Zelloberfläche beteiligt, da Perjodat, das durch Oxydation der hydroxylischen Gruppen und Ringspaltung Kohlenhydrate angreift (DANISHEFSKY et al. 197o), die Aggregation nicht hemmt. Insbesondere scheinen auch N-Acetylneuraminsäure-Reste, die zumindest bei Wirbeltierzellen ein wesentlicher Bestandteil der Zelloberfläche sind (WINZLER 197o), nicht direkt als spezifische Rezeptorgruppen beteiligt zu sein, da ein Zusatz von freier N-Acetylneuraminsäure keine Hemmung bewirkt.
Der auch die Ergebnisse mit anderen Inhibitoren betreffende Einwand, daß die Hemmstoffe gar nicht auf den Aggregationsmechanismus selber, sondern über den Umweg des Zellstoffwechsels wirken, scheint bei der Hämocytenaggregation nicht zuzutreffen, da die Blockierung der oxydativen Phosphorylierung mit Dinitrophenol keinen Einfluß auf die Aggregation ausübt und die Aggregationshemmung mit dem in dieser Konzentration zelltötend wirkenden Quecksilberchlorid reversibel ist. Ebenso ist die Dictyostelium-Aggregation energieunabhängig (GERISCH 1968) und natürlich auch die formalinfixierter Limulus-Hämocyten, nicht jedoch die der Thrombocyten (Übersicht: MUSTARD u. PACKHAM, 197o).
Abschließend sei es gestattet, einige Spekulationen über die bei der Aggregation wirkenden

Bindungskräfte anzustellen. Die für die Adhäsion von Zellen fnfrage kommenden Wechselwirkungen wurden u.a. vonPETHICA (1961) und L.WEISS (1967, 197o) diskutiert. Es seien hier nur die folgenden genannt:

- kovalente Bindungen, z.B. Thiol-, Amid-, Ester-Bindungen;
- Wasserstoff-Brücken;
- Ionen-Bindungen, z.B. $-NH_3^{+\cdots-}OOC-$; (hierzu wäre auch die Brückenbildung über zweiwertige Ionen, z.B. $-COO^{-\cdots}Ca^{2+\cdots-}OOC-$ und die elektrostatische Anziehung gleichsinnig geladener Oberflächen durch Zwischenlagerung einwertiger Ionen zu zählen);
- hydrophobe Wechselwirkungen, und
- van der Waals'sche Anziehungskräfte.
- Ihnen wirkt die durch die negative Nettoladung der Zelloberfläche bewirkte elektrostatische Abstoßung entgegen.

Über die Rolle kovalenter Bindungen können, ebenso wie über die von Wasserstoffbrücken, anhand der vorliegenden Daten kaum Aussagen gemacht werden. Die Beteiligung von SH-Gruppen wird durch die hemmende Wirkung von Quecksilberchlorid, die durch Cysteinzugabe rückgängig gemacht werden kann, und diejenige von N-Äthylmaleinimid deutlich, das unter den gegebenen Bedingungen (kurze Wirkdauer, pH nahe 7) SH-gruppenspezifisch reagieren dürfte (vergl. BREWER u. RIEHM 1967). Ob sie jedoch so zu interpretieren ist, daß im Verlauf der Aggregation S-S-Brücken zwichen Zelloberfläche und Plasmafaktor, bzw. direkt zwischen den Oberflächen, gebildet werden, erscheint zweifelhaft, da es bei der dafür notwendigen exponierten Lage der SH-Gruppen schwer

verständlich wäre, daß nur ein Teil der SH-spezifischen Inhibitoren wirksam ist und auch bei Zusatz von Cystein oder Glutathion als Konkurrenzsubstraten die Aggregation nicht bzw. nur gering gehemmt wird. Daß das sehr stark reduzierend wirkende Dithioerythrit hemmend wirkt, findet eine plausible Erlärung in der Annahme von S-S-Brücken, die für die Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur am Prozeß beteiligter Proteine essentiell sind.
Evtl. könnte das Verhalten gegenüber SH-Inhibitoren auch auf die Beteiligung enzymatisch wirkender Aggregationsfaktoren mit SH-Gruppen im aktiven Zentrum hindeuten.
Was die Bedeutung von Ionen-Bindungen bei der Adhäsion der Hämocyten betrifft, so wurde schon erwähnt, daß Calcium-Brücken auszuschließen sind. Aminogruppen, die durch Trinitrobenzolsulfonsäure spezifisch blokkiert werden können, spielen offensichtlich ebenfalls keine Rolle. Ob die Beteiligung anderer basischer Gruppen, wie sie die hemmende Wirkung von Suramin nahelegt, das nach WILLS u. WORMALL (1950) mit basischen Gruppen reagieren soll, in diesem Sinne zu interpretieren ist, muß offenbleiben. Insgesamt scheinen Ionen-Bindungen als Ursache der Adhäsion weniger wahrscheinlich zu sein, da die Aggregation auch bei hoher Ionenstärke ungehindert (vielmehr sogar beschleunigt) abläuft. Die pH-Abhängigkeit in diesem Zusammenhang zu betrachten, scheint wenig sinnvoll, da sich für sie zu viele Interpretationsmöglichkeiten anbieten. Kein Hinweis konnte gefunden werden, der für das Adhäsionsmodell von B.M.JONES (1966) und P.T.C.JONES (1966) spräche, das von Veränderungen der Oberflächenladung ausgeht, die durch die Kontraktion eines Actomyosin-ähnlichen, ATP-

spaltenden Proteins und einer dadurch bewirkten Faltung der mit Ladungen besetzten Zelloberfläche bewirkt werden; weder ATP noch die Entfernung des ebenfalls nach dem Modell wesentlichen Calciums zeigen bei der Hämocytenaggregation eine Wirkung. Hydrophobe Wechselwirkungen spielen beim Aufbau biologischer Membranen und der Tertiärstruktur von Proteinen eine große Rolle (SINGER 1971). Es ist denkbar, daß sie auch bei der Zelladhäsion beteiligt sind. Auf dieser Basis wäre evtl. die hemmende Wirkung des nichtionischen Detergens Tween 80 erklärbar, das sich möglicherweise mit seinen hydrophoben Enden an entsprechende Reste der Zelloberfläche bzw. des Plasmafaktors heftet und sie umhüllt. Allerdings sind, wie SINGER betont, hydrophobe Reste aus thermodynamischen Gründen vermutlich hauptsächlich im Innern der Proteine bzw. der Membran versteckt. Es ist denkbar, daß das Tween nur auf den Plasmafaktor wirkt, indem es diesen in Untereinheiten spaltet o.ä. Nichtionogene Detergentien wirken mild dissozierend auf Membranen und komplexe Proteine (TZAGOLOFF u.PENEFSKY 1971). Eine schädigende Wirkung auf die Zelloberfläche ist, wie schon oben erwähnt, weniger wahrscheinlich, da die Hämocyten auch nach Tweenbehandlung bei Plasma-Zugabe aggregieren.
Van der Waals'sche Kräfte bilden, zusammen mit der elektrostatischen Abstoßung, die Grundlage der DERJAGUIN/LANDAU-VERWEY/OVERBEEK (DLVO) - Theorie der Kolloide und sind nach WEISS (1967, 1970) auch für Zellkontakt und - Adhäsion wesentlich. Über ihre Bedeutung bei der Hämocytenaggregation kann jedoch anhand des bisherigen Materials nichts ausgesagt werden.

Schließlich sei noch einmal daran erinnert, daß diese sehr simplifizierenden Überlegungen nicht mehr als Anregungen für tieferergehende, systematische Untersuchungen sein können, in denen z.B. auch die hier nicht behandelte Frage berührt werden müßte, wie die für die Zellaggregation verantwortlichen Gruppen auf der Zelloberfläche bzw. am Plasmafaktor mit Auslösung der Aggregation aktiviert bzw. - soweit sie für die elektrostatische Abstoßung der Zellen verantwortlich sind - unwirksam gemacht werden.

Zusammenfassung

1. Es wird ein photometrischer Test zur quantitativen Messung der Hämocytenaggregation im Blut von Crustaceen beschrieben.

2. Aus Homogenaten ist ein Gewebsfaktor isolierbar, der eine starke aggregationsbeschleunigende Aktivität aufweist. Es ist ein Lipid, das in der Dünnschichtchromatographie mit dem hier verwendeten Laufmittel einen den Sterinen entsprechenden Rf-Wert aufweist.

3. In Hämocyten ist ebenfalls, neben wenig lipidlöslicher Aktivität, ein hochwirksamer, acetonunlöslicher Faktor enthalten.
Er ist nicht dialysabel und hitzestabil.

4. Mit Tween 80-Lösung gewaschene Hämocyten benötigen zur raschen Aggregation einen plasmatischen Cofaktor, der hitzelabil und nicht dialysabel ist.

5. Die Aggregation ist unterhalb von pH 6 und oberhalb pH 9 vollständig gehemmt, das Optimum liegt beim physiologischen pH von 7,5.

6. Der Einfluß 34 verschiedener Substanzen (gruppenspezifische Reagenzien, Nucleotide, Pharmaka u.a.) auf die Hämocytenaggregation wurde untersucht.

7. Das Zusammenwirken der einzelnen Faktoren im Aggregationsprozeß und mögliche molekulare Mechanismen der Aggregation werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

ANDREWS, P. (1967): Über den Blutchemismus des Flußkrebses Orconectes limosus und seine Veränderungen im Laufe des Jahres. Z. vergl. Physiol. 57, 7-43

BANG, F.B. (1971): A factor in crab amebocytes which stimulates in vitro clotting of crab blood. J. Invertebr. Pathol. 18, 280-283

BAIER, R.E. (1970): Surface properties influencing biological adhesion. In R.S. MANLY (Ed.): Adhesion in biological systems. London, New Yorck: Acad. Press, 15-48

BELDEN, D.A.Jr. and R.R. COWDEN (1971): Detection of early changes in cockroach hemocytes during coagulation with 8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid. Experientia 27, 448-449

BORN, G.V.R. (1962): Aggregation of blood platelets by adenosinediphosphate (ADP) and its reversal. Nature 194, 927-929

BREWER, C.F. and J.P. RIEHM (1967): N-Äthylmaleinimid. Anal. Biochem. 18, 248

COLLATZ, K.-G. (1969): Das Lipidspektrum des Flußkrebses Orconectes limosus und seine jahreszeitlichen Veränderungen. Z. vergl. Physiol. 65, 274-290

COMAN, D.R. (1961): Adhesiveness and stickiness: two independent properties of the cell surface. Cancer Res. 21, 1436-1438

DAMBOVICEANU, A. (1932): Composition chimique et physiochimique du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes. I. La coagulation chez les crustacés décapodes. Arch. Roumaines Pathol. Exp. Microbiol. 5, 244-249

DANISHEFSKY, I., R.L. WHISTLER and F.A. BETTELHEIM (1970): Introduction to polysaccharide chemistry. In W. PIGMAN and D.HARTON (Ed.): The carbohydrates. London, New Yorck: Acad. Press, 375-412

FOLCH, J., M. LEES and G.H. SLOANE-STANLEY (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 496-507

FREDERICQ, L. (1879): Note sur le sang du homard. Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. (2) 47, 409-413

GERISCH, G. (1968): Cell aggregation and differentiation in Dictyostelium. Curr. Top. Dev. Biol. 3, 157-197

GLAVIND, J. (1948): Studies on the coagulation of crustacean blood. Copenhagen

GREGOIRE, C. (1953): Blood coagulation in arthtopods. III. Reactions of insect hemolymph to coagulation inhibitors of vertebrate blood. Biol. Bull. 104, 372-381

GREGOIRE, C. and H.J. TAGNON (1962): Blood coagulation. In M. FLORKIN and H.S. MASON (Ed.): Comparative Biochemistry, Vol. IV. London, New Yorck: Acad. Press, 435-482

HARDY, W.B. (1892): The blood corpuscles of the crustacea, together with a suggestion as to the origin of the crustacean fibrin-ferment. J. Physiol. 13, 165-190

HOFFMANN, J.A. and M.E. STOECKEL (1968): Sur les modifications ultrastructurales des coagulocytes au cours de la coagulation de l'hémolymphe chez un insecte orthoptéride: Locusta migratoria L. C.R. Soc. Biol. Strasbourg 12, 2257-2258

JONES, B.M. (1966): A unifying hypothesis of cell adhesion. Nature 212, 362-365

JONES, P.T.C. (1966): A contractile protein model for cell adhesion. Nature 212, 365-369

LECHLER, E. und R. GROSS (1962): (Blut)-Gerinnung und Wundverschluß bei Invertebraten. Thromb. Diath. Haemorrh. 8, 355-392

LILIEN, J.E. (1969): Toward a molecular explanation for specific cell adhesion. Curr. Top. Dev. Biol. 4, 169-195

LOEB, L. (1910): Über die Blutgerinnung bei Wirbellosen. Biochem. Z. 24, 478-495

MASSINI, P. and LUESCHER, E.F. (1972): On the mechanism by which cell contact induces the release reaction of blood platelets; the effect of cationic polymers. Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 121-133

MICHAL, F. and B.G. FIRKIN (1969): Physiological and pharmacological aspects of the platelet. Ann. Rev. Pharmacol. 9, 95-118

MORRISON, P.R. and K.C. MORRISON (1952): Bleeding and coagulation in some Bermudan crustacean. Biol Bull. 103, 395-406

MORRISON, P.R. and W.H. ROTHMAN (1957): Agglutination of blood cells in Limulus polyphemus. Proc. Soc. Exp. Biol. 94, 21-23

MOSCONA, A.,(1968): Cell aggregation: Properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems. Develop. Biol. 18, 250-277

MUSTARD, J.F. and M.A. PACKHAM (1970): Factors influencing platelet function: Adhesion, release and aggregation. Pharmacol. Rev. 22, 97-187

PETHICA, B.A. (1961): The physical chemistry of cell adhesion. Exp. Cell Res., Suppl. 8, 123-140

SCHULZ, N. (1925): Das Blut der Wirbellosen Tiere, E.: Crustaceen. In H. WINTERSTEIN (Hrsg.): Handbuch der vergl. Physiologie, Bd.I, 669-746

SEEGERS, W.H. (1971): Theory of blood coagulation: three basic reactions. Tromb.Diath.Haemorrh.,Suppl.46,63-86

SEEMAN, P.M. (1966): Membrane stabilization by drugs: tranquilizers, steroids and anaesthetics. Int. Rev. Neurobiol. 9, 145-221

SEEMAN, P., D. CHENG and G.H. ILES (1973): Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. J. Cell. Biol. 56, 519-527

SINGER, S.J. (1971): The molecular organisation of biological membranes. In L.I. ROTHFIELD (Ed.): Structure and function of biological membranes. London, New Yorck: Acad. Press, 145-222

SKIPSKI, V.P., A.F. SMOLOWE, R.C. SULLIVAN and M. BARCLAY (1965): Separation of lipid classes by thin-layer chromatography. Biochem. Biophys. Acta 106, 386-396

STANG-VOSS, C. (1971): Zur Ultrastruktur der Blutzellen wirbelloser Tiere. V. Über die Hämocyten von Astacus astacus (L.). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 122, 68-75

TAIT, J. and J.D. GUNN (1917): The blood of Astacus fluviatilis: a study in crustacean blood, with special reference to coagulation and phagocytosis. Quart. J. Exptl. Physiol. 12, 35-80

TAYLOR, A.C. (1970): Adhesion of cells to surfaces. In R.S. MANLY (Ed.): Adhesion in biological systems. London, New Yorck: Acad. Press, 51-71

TZAGOLOFF, A. and H.S. PENEFSKY (1971): Extraction and purification of lipoprotein complexes from membranes. Methods Enzymol. 22, 219-230

VAN HARREVELD, A. (1936): A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 34, 428-432

VERMYLEN, J., M.B. DONATI and G. DE GAETANO (1971): Protein requirement for platelet aggregation. Acta Med. Scand. Suppl. 525, 19-26

WEISS, L. (1967): The cell periphery, metastasis and other contact phenomena. Amsterdam: North-Holland Publ.

WEISS, L. (1970): Cell contact phenomena. In Vitro 5, 48-78

WILLS, E.D. and A. WORMALL (1950): Isoelectric points of enzymes as determined by inhibition with suramin. Nature 165, 813-814

WINZLER, R.J. (1970): Carbohydrates in cell surfaces. Int. Rev. Cytol. 29, 77-125

Lebenslauf

Ich wurde am 24.12.1946 in Marburg als 4. Kind des Universitätsprofessors Richard Hamann-MacLean und seiner Frau Hedwig, geb. Fuhrmann, geboren.
Von 1953 - 1957 besuchte ich die dortige Grundschule, anschließend das altsprachliche Gymnasium, an dem ich 1966 das Abitur machte.
Ich begann mein Studium im SS 1966 an der Freien Universität Berlin. Das Vordiplom legte ich zu Beginn des 5. Semesters ab. Anfang 1970 begann ich unter der Anleitung von Prof. Keller mit den Arbeiten zu meiner Dissertation.